



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OBSAH VONNÝCH LÁTEK V NEČOKOLÁDOVÝCH  
CUKROVINKÁCH**

THE CONTENT OF AROMA COMPOUNDS IN SWEETS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Petra Polochová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1112/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Petra Polochová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Obsah vonných látek v nečokoládových cukrovinkách

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - nečokoládové cukrovinky – charakteristika, složení, vlastnosti
  - technologie výroby
  - vonné/aromaticky aktivní látky – charakteristika, rozdělení; aromatické látky v cukrovinkách
  - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS) – princip, popis, instrumentace
2. Pomocí metody SPME–GC–MS identifikujte vonné látky ve vzorcích nečokoládových cukrovinek
3. Porovnejte aromatický profil jednotlivých vzorků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Petra Polochová  
student(ka)

-----  
Ing. Eva Vítová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací aromaticky aktivních látek ve vzorcích nečokoládových cukrovinek.

Teoretická část se zabývá legislativou a technologií výroby nečokoládových cukrovinek, charakterizací aromatických látek včetně potenciálně alergenních. Také je popsána metoda jejich stanovení pomocí mikroextrakce pevnou fází a plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

V experimentální části byla vybraná SPME-GC-MS metoda použita k identifikaci těkavých aromaticky aktivních látek ve vybraných vzorcích želatinových bonbonů, zakoupených v běžné tržní síti. U potenciálně alergenních vonných látek byla navíc provedena i kvantifikace.

Jednotlivé vzorky se v závislosti na výrobci a typu příchutě lišily v počtu a typu těkavých sloučenin. Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 246 sloučenin, z toho 30 uhlovodíků, 66 alkoholů, 7 etherů, 20 aldehydů, 24 ketonů, 56 esterů, 13 karboxylových kyselin, 3 fenoly, 16 heterocyklických sloučenin, 6 laktonů a 5 ostatních sloučenin (jednalo se o linalooloxid; methylsulfonylmethan; dimethylsulfoxid; 1,1-diisobutoxy-isobutan a propanamid).

## ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on identification of aroma active substances in samples of non-chocolate sweets.

The theoretical part deals with the legislation and technology of manufacturing non-chocolate sweets, characterization of aroma compounds including those which could be allergenic. Furthermore this thesis describes a method of their determination using solid phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometry (SPME-GC-MS) is described.

In the experimental part, the chosen method SPME-GC-MS method was used to identify volatile aroma active substances in selected samples of jelly sweets purchased in a conventional market. The substances that are potentially allergenic were also quantified.

The single samples differ in number and type of volatile compounds depending on producer and flavour. Altogether 246 compounds were identified, of which 30 hydrocarbons, 66 alcohols, 7 ethers, 20 aldehydes, 24 ketones, 56 esters, 13 carboxylic acids, 3 phenols, 16 heterocyclic compounds, 6 lactones and 5 others (linalooloxide; methylsulphonylmethan; dimethylsulphoxide; 1,1-diisobutoxy-isobutane and propanamide).

## KLÍČOVÁ SLOVA

cukrovinky, aromaticky aktivní látky, SPME, GC-MS

## KEYWORDS

sweets, aroma active compounds, SPME, GC-MS

POLOCHOVÁ, P. *Obsah vonných látek v nečokoládových cukrovinkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 57 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou/bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studentky

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Evě Vítové, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Velké poděkování patří i mé rodině, která je pro mě během celého studia tou největší oporou.*

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Nečokoládové cukrovinky .....	8
2.2	Technologie výroby nečokoládových cukrovinek.....	9
2.2.1	Cukrovinky s nevykrystalizovanými cukry.....	9
2.2.1.1	Želé .....	9
2.2.1.2	Gumovité cukrovinky .....	10
2.2.1.3	Kandyty.....	11
2.2.1.4	Karamely.....	12
2.2.1.5	Šlehané cukrovinky.....	12
2.2.2	Cukrovinky s vykrystalizovanými cukry .....	12
2.2.2.1	Fondánové cukrovinky.....	12
2.2.2.2	Komprimáty .....	12
2.2.2.3	Marcipán .....	13
2.3	Aromaticky aktivní látky .....	13
2.4	Legislativa aromaticky aktivních látek.....	15
2.4.1	Potenciálně alergenní vonné látky.....	15
2.5	Použité metody a experimentální techniky.....	20
2.5.1	Mikroextrakce tuhou fází .....	20
2.5.2	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí .....	21
3	Experimentální část .....	23
3.1	Použité laboratorní vybavení a chemikálie.....	23
3.1.1	Chemikálie (standardy) .....	23
3.1.2	Laboratorní vybavení .....	23
3.1.2.1	Přístroje .....	23
3.1.2.2	Plyny .....	24
3.1.2.3	Pracovní pomůcky .....	24
3.2	Analyzované vzorky .....	24
3.3	Metoda SPME-GC-MS.....	26
3.3.1	Podmínky SPME extrakce .....	26
3.3.2	Podmínky GC-MS analýzy .....	26
3.3.3	Vyhodnocení výsledků SPME-GC-MS analýzy .....	26

3.3.3.1	Příprava kalibračních přímek standardů .....	26
3.3.3.2	Identifikace a kvantifikace aromaticky aktivních látek ve vzorcích.....	27
3.4	Statistické zpracování výsledků.....	27
4	Výsledky a diskuze.....	28
4.1	Identifikace aromaticky aktivních látek ve vzorcích .....	28
4.1.1	Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích od různých výrobců .....	39
4.2	Identifikace a kvantifikace alergenních aromaticky aktivních látek ve vzorcích.....	41
5	Závěr.....	46
6	Seznam použitých zdrojů .....	47
7	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	51
8	Seznam příloh.....	52
9	Přílohy .....	53

# 1 ÚVOD

Historie nečokoládových cukrovinek sahá až do starověku. Již stoly starých Řeků i Římanů nabízely množství sušeného sladkého ovoce, různé druhy koláčků a jiných pochutin. Námořní objevy z přelomu 15. a 16. století pak do Evropy přivezly i cukr, původem z Indie. Velký rozmach ale zaznamenala výroba cukrovinek až během 19. století, kdy začaly vznikat dodnes známé společnosti jako Nestlé, Lindt nebo Toblerone.

Dnešní trh nabízí obrovské množství cukrovinek, ať už čokoládových nebo nečokoládových. Nečokoládovými cukrovinkami rozumíme jiné potraviny než čokoládu nebo čokoládové bonbóny. Jejich přesná definice, složení a rozdělení jsou stanoveny vyhláškou Ministerstva zemědělství.

V dnešním konkurenčním boji je neopominutelným faktorem aromatizace cukrovinek, neboť představou konzumenta je příjemná vůně, barva a chuť výrobku a právě na těchto vlastnostech záleží, zda si spotřebitel výrobek koupí, či nikoliv. Aromatické látky jsou chemicky definované látky, jež působí na čichové nebo chuťové receptory člověka a vyvolávají vjem vůně a chuti.

Některé látky používané se k aromatizaci náleží do skupiny potenciálních alergenů a jejich množství by tedy v potravinách mělo být pouze stopové. Mezi přírodními aromatizujícími látkami jsou dokonce takové, jež se do potravin nesmějí přidávat z bezpečnostních důvodů.

Teoretická část této práce je zaměřena na literární rešerši k charakterizaci nečokoládových cukrovinek a jejich zpracování a k tématu aromaticky aktivních látek se zaměřením na potenciální alergeny. Experimentální část si klade za cíl identifikovat aromatické látky v nečokoládových cukrovinkách s použitím metody SPME-GC-MS a kvantifikovat ty z nich, jež jsou legislativou označovány jako potenciální alergeny.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část je zaměřena na nečokoládové cukrovinky, jejich charakteristiku, technologii výroby a na legislativu rozdělující nečokoládové cukrovinky do jednotlivých skupin. Dále jsou zde popsány aromaticky aktivní látky (AAL) a možnost jejich použití pro aromatizaci potravin. Hlavní pozornost je pak zaměřena na ty aromatické látky, jež jsou legislativou označovány jako potenciálně alergenní.

### 2.1 Nečokoládové cukrovinky

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 76/2003 Sb. se cukrovinkami rozumí potraviny jiného druhu než čokoláda a čokoládové bonbony. Jejich základní složku tvoří přírodní sladidla, sladidla<sup>1</sup> a další složky. Kakaové součásti nebo čokoláda ale mohou tvořit jednu ze složek cukrovinek. V názvu výrobku může být použito „s čokoládou“ či jiné podobné spojení pouze v případě, kdy je její obsah ve výrobku větší než 5 %. Základní rozdělení nečokoládových cukrovinek shrnuje Tabulka 1 [1].

Vzhledem k zaměření experimentální části mé práce je dále věnována pozornost především cukrovinkám typu želé, které legislativa definuje jako „cukrovinky s konzistencí gelu vzniklou přidáním želírujících látek, především želatiny, agaru, škrobu nebo pektinu“ [1].

*Tabulka 1: Rozdělení cukrovinek [1]*

Druh	Skupina	Podskupina
cukrovinky	karamely	tukové s jádrovinami s ovocnou příchutí mléčné, kakaové nebo kávové podle druhu vložky (cukrová, želé, jádroviny, sušené nebo proslazené ovoce, marcipán, atd)
	dražé	
	želé	
	rahat chalva turecký med	
	lékořicové cukrovinky	
	pěnové cukrovinky (marshmallow)	
	komprimáty	balónkové (bubble gum) plátkové dražované
	žvýkačky	
	dropsy	
	roksy	s tukovou náplní s cukernou (sirupovou) náplní
	furé	
	marcipán	
	fondánové cukrovinky	

<sup>1</sup> Stanovená vyhláškou č. 304/2004 Sb.



## 2.2 Technologie výroby nečokoládových cukrovinek

Výroba nečokoládových cukrovinek má dlouho historii, neboť okolo roku 2000 př. n. l. již staří Egypťané prokazatelně znali cukrovinky. Základem cukrovinek byl dlouho med, protože sacharóza v dnešní formě ještě nebyla známa. I staří Řekové a Římané znali výrobu různých cukrovinek, což dokládají nálezy vybavených cukrářských dílen. Důležitým prvkem výroby cukrovinek byla izolace třtinové sacharózy, která se nejprve objevila v Indii a odtud se rozšířila do arabských států a následně i do Evropy. Vysoká cena cukru ale dělala dlouhou dobu z cukrovinek vzácné zboží. Teprve v druhé polovině 19. století, kdy došlo k rozvoji výroby cukru z řepy, se staly nečokoládové cukrovinky cenově dostupnější [2].

Dnes tvoří základ výroby všech nečokoládových cukrovinek roztok nebo suspenze sacharózy a škrobového sirupu ve vodě. Roztoky obsahující sacharózu a škrobový nebo maltózový sirup jsou nazývány cukrosirupové roztoky [8].

Škrobový sirup zabraňuje krystalizaci sacharózy a pomáhá tak vytvářet amorfní stav cukerné hmoty. Přidáním škrobového sirupu se také snižuje rozpustnost sacharózy proti čistým roztokům. Krystalizaci může škrobový sirup nebo sirup maltózový zcela zabránit, protože se rozšiřuje střední oblast přesycení. Této vlastnosti se využívá při výrobě kandytů a želé. Poměr hmotností škrobového sirupu a cukru je udáván tzv. varným poměrem, který se v případě jednotlivých cukrovinek liší [8].

Podobné vlastnosti jako škrobový sirup má i invertní cukr, jehož přidávání do cukrovinek má však několik nevýhod. Takto vzniklá hmota je více hygroskopická a invertní cukr navíc zvyšuje sladkost hmoty [2].

### 2.2.1 Cukrovinky s nevykrystalizovanými cukry

#### 2.2.1.1 Želé

Želé jsou cukrovinky s konzistencí tuhého rosolu, k jejichž výrobě se využívá sacharóza, škrobový sirup, želírující látky, kyseliny, aromatické látky a barviva. Podle druhu použité želírující látky pak rozlišujeme jednotlivé skupiny želé [2, 26].

*Želatinové želé* jako hlavní složku obsahuje želatinu vyráběnou z kolagenových látek. Želatina je nejprve rozpuštěna ve vodě při teplotě okolo 60°C. Zároveň se připraví cukerný roztok svařením sacharózy a škrobového sirupu v poměru 2:1 až 1:1 při teplotě 113-121 °C. Po vychladnutí cukerného roztoku na 100 °C se do něj pomalu přimíchává rozpuštěná želatina. Jelikož je pro tvorbu želatinového gelu optimální oblast pH okolo 4, zatímco pH želatiny se pohybuje v rozmezí 4,5 až 5,5, je nutné provést okyselení, k němuž se nejčastěji používá kyselina citrónová. Výsledná hmota se nalévá do škrobových forem [2, 26].

*Želé agarové* se vyrábí z práškovitého nebo vláknitého agaru získávaného z mořských řas. Nejprve se agar musí namočit v dostatečném množství čisté vody a následně se rozpouští při teplotě kolem 90 °C. Do rozpuštěného agaru se přidá sacharóza a roztok se svaří na 105-107 °C. Poté se přidá škrobový sirup a roztok se ochladí na teplotu 60°C, při níž jsou přidávány kyseliny, barviva a aroma. Ochucená a obarvená hmota se formuje vyléváním na stoly, kde je po ztuhnutí rozřezána na kostky, nebo se nalévá do škrobových forem [2, 26].

*Pektinové želé* se řadí k nejkvalitnějším želé, avšak jeho příprava je obtížná a je nutno striktně dodržovat všechny podmínky výroby. Pektin se získává z usušených citrusových nebo

jablečných výlisků, jež se extrahují okyselenou vroucí vodou. Typ získaného pektinu je dán extrakčními podmínkami. Pektin se nejčastěji využívá v práškovém stavu vzhledem k snazšímu dávkování i lepší skladovatelnosti, ale lze použít i pektin tekutý. V prvním kroku se práškovitý pektin nejprve smíchá se sacharózou a teprve pak se rozpustí ve vodě, aby se předešlo tvorbě hrudek. Obsah sacharózy v roztoku nesmí být vyšší než 20 %. Následně se za varu přidává část kyseliny a škrobový sirup plnící funkci antikrystalizátoru. Roztok se povaří, potom se do něj přidá zbytek sacharózy a svaří se na 75-79 % sušiny. Po ochlazení se přidá zbývající kyselina a hmota je okamžitě nalévána do forem z důvodu rychlého tuhnutí. K částečné regulaci tuhnutí se používá citronan nebo octan sodný [2, 26].

*Želé škrobové* patří spíše k orientálním cukrovinkám. Typickým představitelem tohoto typu cukrovinky je rahat. Při výrobě se používá různých modifikovaných škrobů se sníženou viskozitou a zvýšenou tekutostí mazů, což umožňuje snáze rozmíchat ostatní suroviny [2, 26].

#### **2.2.1.2 Gumovité cukrovinky**

Při výrobě gumovitých cukrovinek jsou kromě základních surovin, sacharózy a škrobového sirupu, přidávány také látky zodpovědné za typickou gumovitou konzistenci. Původně k tomuto účelu sloužila arabská guma, ale ačkoli je arabská guma dodnes hojně používána, postupně ji do pozadí vytlačují jiné alternativy jako želatina, agar, pektin, škrob a modifikovaný škrob [2, 34].

Vybraná želírující látka se nejprve rozpustí ve vodě, přičemž je někdy vhodné nechat látku namočenou přes noc, a poté se přivede k varu. Následně se přidá cukr a kukuřičný sirup a dávka je opět zahráta na teplotu varu. Výsledná teplota pak už závisí na typu připravovaného výrobku [34].

Při výrobě gumovitých cukrovinek ze želatiny je nutno zamezit porušení její želírující mohutnosti, která ovlivňuje vydatnost želatiny a tím i její kvalitu. Želatina se rozpouští při teplotě 30 až 40 °C a při teplotách okolo 60 °C lze připravit roztoky o koncentraci 30 %. V případě aplikace vyšších teplot se už začíná želatina rozkládat a snižuje se pevnost gelu. Cukrosirupový roztok se připravuje při teplotách 115 – 121 °C a před přidáním želatiny je nutno jej zchladit pod 100 °C. Smíchaný produkt prochází ještě procesem číření, aby se uvolnily bublinky vzduchu a vznikla čirá hmota [2, 17].

Po obarvení a ochucení je gumovitá hmota nalévána do forem. Během prvních 10-12 hodin jsou tyto formy ponechány v prostoru o běžné teplotě, aby se tak zamezilo tvorbě tuhé kožovité vrstvy na povrchu výrobku. Poté se okolní teplota postupně zvyšuje přibližně na 46 °C. Doba sušení cukrovinky je závislá na požadované konzistenci, některé výrobky se ponechávají sušit pouze do následujícího dne, některé i několik dní. Po sušení se cukrovinky odpudrují a následně probíhají finální úpravy, kdy jsou cukrovinky leštěny olejem, obalovány krystalovým cukrem nebo lakovány sandarakem rozpuštěným v alkoholu [18].

Při použití arabské gummy je nutná správná příprava roztoku této suroviny. Obvykle se roztok připravuje z předem rozdrcených a rozemletých kusů arabské gummy na hrubý prášek. Za studena se guma rozpouští jen zřídka, obvykle se využívá rozpouštění za horka, kdy se arabská guma přidá do vroucí vody a za míchání se udržuje teplota 90 až 95 °C. Míchání nesmí být příliš intenzivní, aby se nevytvářela pěna. Stupeň sváření pro cukerný roztok

sacharózy a škrobového sirupu je vyšší než při přípravě želé, bod varu se zde pohybuje mezi 121-136 °C. Výsledná hmota vznikne tak, že se do ještě horkého cukerného roztoku vmíchá roztok arabské gumy [2, 17].

Ke gumovitým cukrovinkám se řadí i žvýkácká guma, při jejíž výrobě se používá jako základní surovina báze udělující výrobku žvýkavý charakter. Buď se jedná o přírodní materiál, tzv. chicle gum, nebo různé syntetické látky. Jako změkčovač slouží sorbitol a dále se používají emulgátory, antioxidanty a aromatické látky ve formě tzv. éterických olejů jako např. pepermintový, pomerančový, citronový nebo skořicový [33].

**Tabulka 2:** Technologické parametry při výrobě želé a gumovitých cukrovinek [2]

	arabská guma	škrob	želatina	agar	pektin
obsah (%)	35-45	9-12	5-12,5	1-1,5	1-1,5
teplota rozpouštění želírující látky (°C)	25	71-82	60-65	87-95	93-100
teplota přidavku kyseliny (°C)	82	93	71-82	76	93
teplota při nalévání do forem (°C)	71-82	82-93	71-72	65-76	82-93
teplota zrání (°C)	20-37	20-37	20-37	35-37	71-82
doba zrání (h)	24	12	4	3	1
vlhkost nalévacího škrobu (%)	5-8	5-8	5-8	5-8	5-10

### 2.2.1.3 Kandyty

Kandyty jsou cukrovinky s tvrdou konzistencí a sklovitým vzhledem. Mívají rozmanité tvary, bývají různě zbarvené a mohou být ochucené, bez náplně i s náplní. Základ jejich výroby tvoří tzv. kandytová hmota, což je amorfni cukerná hmota s velmi nízkým obsahem vody (1-3 %) [2, 26].

Kandytová hmota se připravuje z cukerného roztoku s obsahem vody 20 %, přičemž voda se následně odpaří na nejméně 3 % bez krystalizace za přidavku škrobového sirupu. Poté je nutné hmotu ihned ochladit, aby se zabránilo inverzi, která by zhoršila odolnost kandytů vůči vlhnutí. Během chlazení jsou přidávány kyseliny, aroma a barviva. Ochucená kandytová hmota je následně zpracována v dalších operacích podle toho, jaká kandytová cukrovinka má vzniknout [2, 26].

Kandytová hmota s nejnižším obsahem vody (okolo 1 %) je zpracovávána ražením a vznikají tak dropsy, plněné kandyty a furé. Jednodušší je výroba litých kandyt, kdy je kandytová hmota odlévána při teplotě 135 °C do kovových forem, které následně putují do chladičského tunelu, kde se 20 minut chladí a poté vystupují s teplotou 35 °C [2, 26].

#### **2.2.1.4 Karamely**

Karamely se vyznačují plasticitou, která jim dodává žvýkavý charakter. Kromě základních komponent, cukru a škrobového sirupu, se při jejich výrobě používá kondenzované mléko, máslo, ztužený tuk a další suroviny. Oproti kandytám se svařují s menší intenzitou, mají tedy více vody (4-7 %). Jelikož existuje mnoho druhů karamel, pro vaření se využívá široké rozmezí teplot. České karamely se svařují již při teplotě 137 °C, ale např. tvrdé máslové anglické karamely (tzv. butter scotch) se vaří až při 150 °C. Z důvodu udržení nekystalického stavu, je varný poměr v případě těchto cukrovinek vysoký a pohybuje se v rozmezí 100:60 až 100:100 [2, 26].

Významnou složkou karamel je tuk, který jim dodává vláčnost a současně i pevnost. Nejčastěji se používá tuk ztužený o bodu tání 30-34 °C, který je v karamelové hmotě emulgován. Do karamel se také přidávají nejrůznější chuťové přísady jako vanilin, káva, kakao, ovocné tresti aj. [2, 26].

#### **2.2.1.5 Šlehané cukrovinky**

Základní hmotu šlehaných cukrovinek tvoří pěna vznikající šleháním cukerného roztoku za přidavku pěnotvorného činidla. Šlehání probíhá ve šlehačích, kdy po uvolnění tlaku vzduch v pěně expanduje a bubliny tak zvětší objem hmoty. Úkolem pěny je výrobek „zlehčit“ a vytvořit porézní hmotu, aby se rozplývala v ústech [2, 26].

### **2.2.2 Cukrovinky s vykrystalizovanými cukry**

#### **2.2.2.1 Fondánové cukrovinky**

Fondánové cukrovinky mají polotuhou až tuhou konzistenci a základem jejich výroby je fondánová hmota. Výchozím prvkem výroby je fondánový roztok, který se získává rozpuštěním a svařením sacharózy se škrobovým sirupem. Stupeň varu se upravuje podle druhu cukrovinky, zpravidla se však pohybuje v rozmezí 117 až 120 °C. Vzniklý fondánový roztok se po částečném ochlazení převádí rušenou krystalizací na krystalickou fondánovou hmotu, která je nalévána do škrobových forem. Škrob používaný pro výrobu forem má být co nejjemnější, proto je nejčastěji využíván škrob kukuřičný. Po ztuhnutí fondánových korpusů se škrob vysype a z hotového korpusu se odstraní stlačeným vzduchem. Fondánové cukrovinky se na závěr chrání proti vysychání procesem zvaným kandýrování. U fondánu se jedná o tzv. mokré kandýrování, při kterém se vložky máčí v přesyceném roztoku sacharózy, tzv. kandysu. Existuje i tzv. suché kandýrování charakteristické pro želé cukrovinky a jedná se v podstatě o výše zmíněné obalování vložek krystalickým cukrem [2, 26].

#### **2.2.2.2 Komprimáty**

Komprimáty jsou ochucené a obarvené práškové směsi lisované do drobných tablet. Hlavní výrobní surovinou je sacharóza, která může být v případě výroby „zdravotních“ komprimátů, nahrazena glukózou. V prvním kroku výroby se smíchá cukr s pojidlem a přidají se mazací látky snižující lepivost směsi. Jako mazací látka se hojně využívá kakaové máslo. Po smíchání

všech složek nastává granulace, při níž se odstraní velký podíl prachových a jemných částic, které by mohly narušovat soudržnost tablety. Připravená sypká směs obsahuje asi 3 % vody, ale hotový výrobek nesmí mít vyšší vlhkost jak 0,5 %, a proto se aplikuje dosoušení ve fluidních sušárnách. Nakonec se přidávají okyselující látky a probíhá lisování [2, 26].

### 2.2.2.3 Marcipán

Marcipán se vyrábí z pařených, oloupaných sladkých mandlí a ze sacharózy. Kvalita marcipánu záleží na kvalitě použitých mandlí. Mandle se nejprve namáčí v převařené vodě o teplotě asi 60 °C, aby se oddělily slupky. Oloupané mandle se pak nahrubo rozdrtí a smíchají s určitým podílem cukru. Hmota se pak zjemňuje ve válcích s drsným povrchem. Jelikož mandlové částice zůstávají větší než částice cukerné, převažuje mandlová chuť [2, 26].

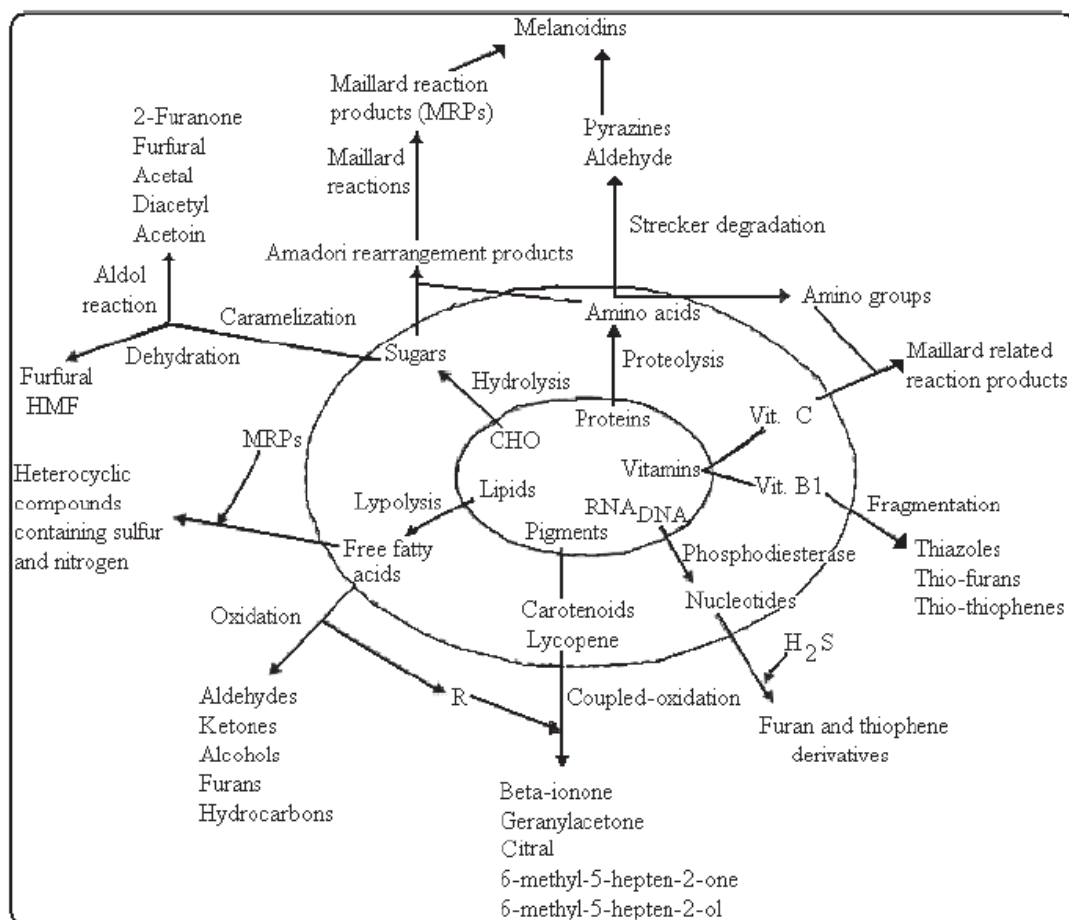
Marcipánová hmota se odvlhčuje tzv. restováním v restovacích kotlích, kde je hmota zahřívána na teplotu 85-92 °C. Po odpaření vody se dosáhne požadované marcipánové hmoty. V hnětacích strojích se marcipánová hmota následně smíchává s práškovým cukrem, škrobovým sirupem, případně fondánem. Do směsi se přidávají i barviva, aromatické látky a různá konzervační činidla. Tvarování marcipánu probíhá různým způsobem a tento druh cukrovinky je i oblíbenou vložkou při výrobě čokoládových dezertů [2, 26].

## 2.3 Aromaticky aktivní látky

Jak již bylo zmíněno, podstatou experimentální části této práce je identifikace aromaticky aktivních látek ve vybraných vzorcích nečokoládových cukrovinek; hlavní pozornost je zaměřena na ty z nich, jež jsou legislativou označovány jako potenciálně alergenní. Sensoricky aktivní látky jsou obecně látky vnímatelné smysly – čichem, chutí, zrakem a často i hmatem. Můžeme je rozdělit do několika hlavních skupin na látky vonné, chuťové, barviva a látky ovlivňující vzhled a fyzikální vlastnosti potravin [7].

Právě vůně, chuť, barva a textura jsou důležité organoleptické vlastnosti potravin a pro spotřebitele jsou mnohdy významnější než jiné důležitější atributy jako je např. obsah vitaminů. Právě tyto vlastnosti totiž vytvářejí první dojem o potravině a ovlivňují tak i dojem celkový. Chuť a vůně se tak stávají důležitým faktorem ve výzkumu nových produktů [7].

Podle původu rozlišujeme sensoricky aktivní látky na primární a sekundární. Primární sensoricky aktivní látky jsou v potravinách již přítomny jako produkty katabolismu, anabolismu či jiných biochemických procesů. Sekundární sensoricky aktivní látky jsou naopak v potravinách přítomny ve vázané a sensoricky inaktivní formě, nejčastěji jako glykosidy. Teprve působením enzymů se z těchto sloučenin uvolňují látky sensoricky aktivní. Sekundární sensoricky aktivní látky vznikají i v průběhu zpracování či skladování potravin jako produkty enzymových či neenzymových reakcí sacharidů, lipidů, bílkovin, případně dalších chemických složek potravin. Důležité chemické reakce při tvorbě sensoricky aktivních látek shrnuje Obrázek 1 [36].



**Obrázek 1:** Vznik sekundárních sensoricky aktivních látek [36]

Zatímco vonné látky působí na čichové receptory a vyvolávají dojem vůně, chuťové látky působí na chuťové receptory a ovlivňují chuť potravin. Chuťové látky mohou současně vonět, ale není to pravidlo. Aromatické látky, resp. aromaticky aktivní látky, jsou látky zahrnující veškeré vonné a chuťové látky působící na dané receptory, které vyvolávají dojem vůně či chuti [7].

Potraviny obvykle obsahují až několik set různých vonných sloučenin, ale pro výslednou vůni jich má zásadní význam pouze několik z nich. Ve výjimečných případech lze typickou vůni potravin spojit s vůní jediné složky nebo několika málo klíčových složek, např. hřebíčková vůně eugenolu nebo skořicová vůně cinnamaldehydu [7].

Mnohé vonné složky mají také schopnost za určitých podmínek vzájemně reagovat. Vznikají tak nové sloučeniny, které způsobují, že ubývá reagujících látek a dochází tím ke změnám organoleptických vlastností celé směsi. K urychlení těchto reakcí přispívají i teplotní podmínky, vzdušný kyslík, vlhkost a některé kovy (hlavně železo). Tyto látky navíc nereagují pouze mezi sebou, mohou také interagovat s bílkovinami, sacharidy a lipidy [2, 7].



## 2.4 Legislativa aromaticky aktivních látek

Nařízení č. 1334/2008/ES definuje aromatické látky jako „chemické látky zahrnující aromatické látky získané chemickou syntézou nebo izolované za použití chemických procesů a přírodní aromatické látky“. Dále toto nařízení definuje také aromatické přípravky, což jsou „látky určené k aromatizaci, ale jiné než definované chemické látky, získané z materiálů rostlinného, živočišného nebo mikrobiologického původu vhodnými fyzikálními, enzymatickými nebo mikrobiologickými procesy“ [4].

K výrobě aromat mohou být použity pouze látky, jejichž vlastnosti nebo koncentrace nejsou pro člověka zdravotně závadné. Legislativa uvádí i materiály, jejichž použití při výrobě aromat je zakázáno nebo je omezeno pouze na určité výrobky. Při použití fyzikálních procesů nesmí docházet ke změnám chemické podstaty složek. V případě využití enzymatických či mikrobiálních procesů musí být použity jen takové enzymy, případně mikrobiální kultury, jež jsou schválené pro potravinářskou výrobu [7].

Za látky určené k aromatizaci se nepovažují potraviny syrové, jež neprošly žádným zpracováním a další potraviny, např. byliny, koření, houby, čaje a látky s výlučně sladkou, kyselou, hořkou nebo slanou chutí a látky rostlinného případně živočišného původu, které mají aroma vlastní [4].

Látky určené k aromatizaci a složky potravin vyznačující se aromatem lze používat v potravinách nebo na jejich povrchu pouze v případě, že nepředstavují žádné zdravotní riziko pro spotřebitele a zároveň jejich používání neuvádí spotřebitele v omyl. I samotné dávkování aromat je velice důležité, pokud dojde k předávkování aroma, obvykle to končí poškozením kvality výrobku [2, 4].

Některé přírodní aromatizující látky se do potravin, tedy i cukrovin, z bezpečnostních důvodů přidávat nesmějí. Příkladem může být rostlinný alkaloid kapsaicin, vyvolávající při styku se sliznicí pálení. V případě některých aromatizujících látek vyskytujících se v přírodě je jejich použití omezeno jen na určité potraviny a jejich množství je v těchto potravinách limitováno. Takovými látkami jsou např. menthofuran nebo pulegon, které se využívají v cukrovinkách s příchutí máty nebo ve žvýkačkách [4].

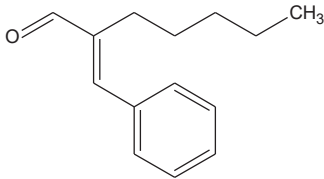
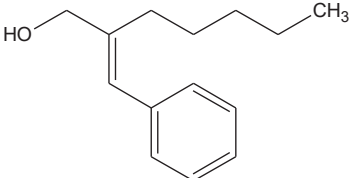
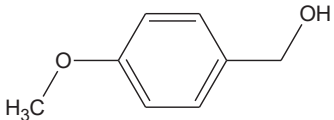
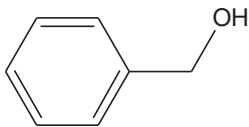
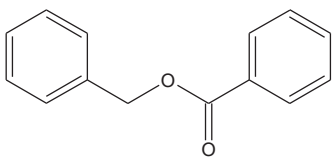
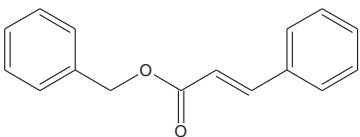
### 2.4.1 Potenciálně alergenní vonné látky

Alergeny jsou látky, které jsou schopny v organismu člověka vyvolat imunitní reakci, kdy dochází k produkci specifických protilátek nebo se aktivuje buněčná imunita. Různé složky potravin mohou působit jako alergen [12].

Kosmetická direktiva 2003/15/EC stanovila 26 vonných látek (Tabulky 3-7), které mohou být potenciálně alergenní. Zároveň ustanovuje výrobcům povinnost označit přítomnost jakékoli z výše zmíněných 26 látek na obalu produktu, jestliže je překročena hranice 0,01 % ( $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) pro konečné výrobky typu „rinse-off“ (smývatelné) a 0,001 % ( $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) pro výrobky typu „leave-on“ (nesmývatelné). Ostatní vonné látky mohou být zahrnuty pod souhrnný termín „perfume“ nebo „aroma“. Pro tyto látky přidávané do potravin samostatný legislativní předpis neexistuje, zmíněné nařízení č. 1334/2008/ES se věnuje obecně všem aromatickým látkám [4, 9].

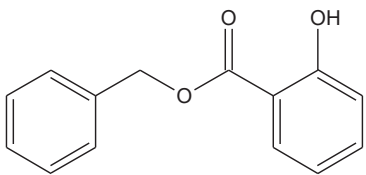
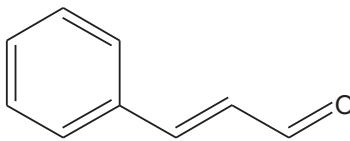
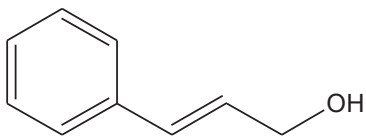
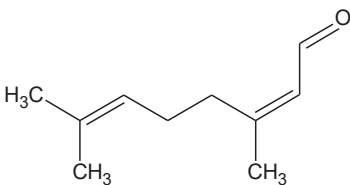
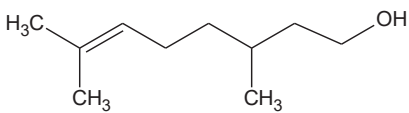
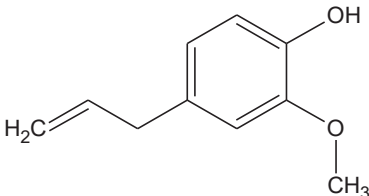
Z uvedených alergenů je v současnosti v potravinářském průmyslu limitován pouze kumarin, u nějž existuje podezření na toxicitu a možné karcinogenní účinky [4, 9].

**Tabulka 3:** Potenciálně alergenní vonné látky [7], [9], [10], [11], [17]

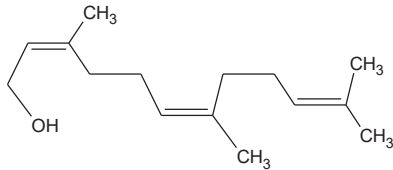
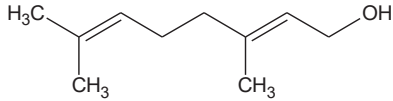
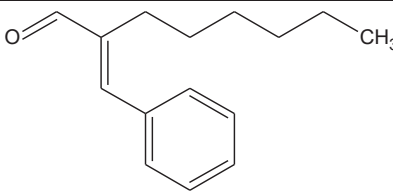
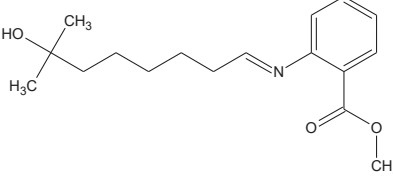
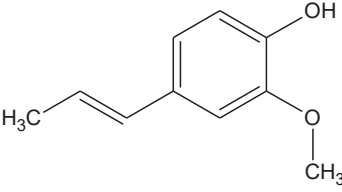
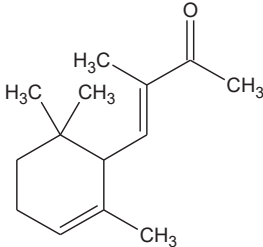
Alergen	Struktura	Vlastnosti a využití
amylcinnamal		Žlutá kapalina s vůní připomínající jasmín. Využívá se k parfemaci v chemickém nebo potravinářském průmyslu, jako ochucovadlo se přidává do cukrátek, žvýkaček nebo do pečiva.
amylcinnamyl alkohol		Bezbarvá až slabě žlutá kapalina s lehkou květinovou vůní. Využívá se pro jemné parfémové kompozice a při výrobě potravin (čaje, cukrovinky).
anisalkohol		Bezbarvá až lehce nažloutlá kapalina, případně krystalická látka vyskytující se hojně v přírodě. Využívá se v kosmetickém průmyslu (krémy, pudry, vonné svíčky) a také jako ochucovadlo (želatina, puding, nápoje).
benzylalkohol		Bezbarvá kapalina s mandlově ovocnou vůní. Vyskytuje se v ovoci (jablka, banány) či v jasmínu, ale i v mase, sýru Cheddar, nebo v pivu. V potravinářství slouží jako aditivum do ovocných nápojů, bonbónů a přidává se také do sirupu proti kašli.
benzylbenzoát		Bezbarvé krystaly, případně olejovitá kapalina s příjemnou vůní po mandlích. Používá se jako fixátor v parfémových kompozicích, je součástí insekticidů a léků proti svrabu.
benzylcinnamát		Bezbarvá až nažloutlá krystalická látka se sladkou vůní po květech a plodech třešní. Využíván do sladkých těžkých aromat a v kosmetice



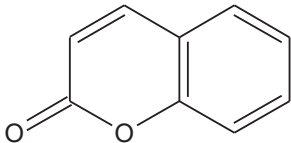
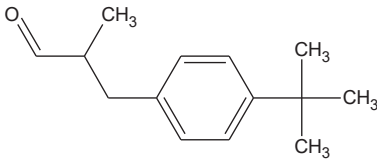
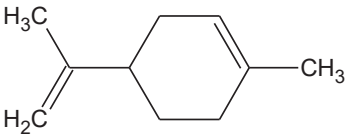
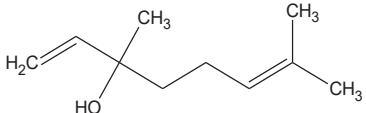
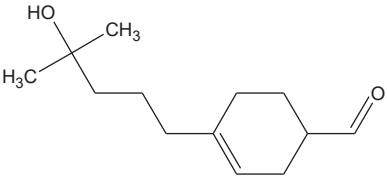
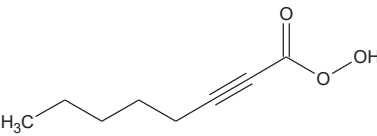
**Tabulka 4:** Potenciálně alergenní vonné látky [7], [9], [10], [11], [17] – pokračování

benzylsalicylát		Lehce narůžovělá kapalina s příjemnou sladkou vůní a ovocnou chutí. Chrání před UV zářením a nalezneme ji v samoopalovacích přípravcích. V parfémtech slouží jako fixativum vonných látek. Pro svůj analgetický a antipyretický účinek je obsahem i některých léčiv
cinnamal		Čirá žlutá kapalina s nasládlou skořicovou vůní. Vyskytuje se v mnoha éterických olejích a je obsažena v kůře skořicovníku. V potravinářství slouží jako koření a v parfumerii jen v technických kompozicích (dráždí pokožku)
cinnamylalkohol		Pevná látka hořké chuti s velmi příjemnou květinovou až skořicovou vůní. Nachází se ve formě esterů v listech a kůře skořicovníku. Využívá se v kosmetickém průmyslu jako aromatická látka a zároveň i jako fixátor.
citral		Světle žlutá olejovitá kapalina s citrónovou vůní. Nachází se v některých silicích (citronelová, silice z Eucalyptus citriodora). Je obsahem čajových směsí nebo kosmetických přípravků.
citronellol		Světle žlutá olejovitá kapalina nasládlé vůně. Přirozeně se vyskytuje v rostlinných olejích, ovoci nebo v černých čajích. Využívá se při výrobě nápojů, v parfémových kompozicích typu růže a bývá součástí některých pesticidů.
eugenol		Bezbarvá až lehce žlutá kapalina silně vonící po hřebíčku. Na vzduchu a světle hnědne. Má aseptické antibakteriální a analgetické účinky. Používá se v mnoha aromatech, bývá součástí insekticidů a využívá se do ústních vod a zubních past

**Tabulka 5:** Potenciálně alergenní vonné látky [7], [9], [10], [11], [17] – pokračování

farnesol		Bezbarvá kapalina květinové vůně. Nachází se v esenciálních olejích a v některých květech. Používá se do aromat typu banán, broskev, meruňka aj. a přidává se do cigaretového tabáku. Má bakteriostatické účinky.
geraniol		Bezbarvá až slabě žlutá kapalina. Je složkou geraniového oleje, nachází se ve většině rostlinných silic a voní po růžích. Používá se v květinových kompozicích a také jako aroma. Má aseptické účinky.
exylcinnamal		Čirá žlutá kapalina s jemnou jasmínovou vůní. Uplatňuje se v kosmetickém průmyslu.
hydroxy-citronellal		Bezbarvá viskózní kapalina s jemnou, sladkou konvalinkovou až liliovou vůní. Vyrábí se synteticky a je součástí parfémových kompozic (lilie, konvalinka) či aromat (lípa, med). Je obsažena i v insekticidech nebo v čisticích prostředcích.
isoeugenol		Světle žlutá kapalina karafiátové vůně. Nalezneme ji v přírodě v mnoha rostlinách. Slouží jako báze karafiátových kompozic a v čajích se používá ke korekci vůně.
$\alpha$ -isomethylionon		Bezbarvá až nažloutlá kapalina fialkovo-irisové vůně. V přírodě se nevyskytuje, ale používá se při výrobě kosmetických produktů.

**Tabulka 6:** Potenciálně alergenní vonné látky [7], [9], [10], [11], [17] – pokračování

kumarin		Bílá krystalická látka s vůní lučního sena nebo vzdáleně připomínající vanilku. Vyskytuje se v pletivech některých rostlin. Využití nachází v potravinářském i kosmetickém průmyslu (mýdla, detergenty). Vykazuje hepatotoxické účinky, ale byly u něj prokázány i účinky antikarcinogenní. Využívá se jako deratizační prostředek proti hlodavcům.
Lilial		Bezbarvá nebo lehce nažloutlá olejovitá kapalina s vůní lipového květu. V přírodě se nevyskytuje. Používá se do sladkých parfémových kompozic.
Limonen		Bezbarvá kapalina citrusové vůně. Na vzduchu může ale snadno zoxidovat a vzniká nepříjemná kmínová vůně. V přírodě ho obsahují např. citrusy, pepř nebo tea tree olej. Využívá se při výrobě syntetických vonných látek.
Linalool		Bezbarvá až světle žlutá kapalina, která vůní připomíná konvalinky. V přírodě je součástí několika silic. Vyskytuje se v ovocných šťávách a používá se v mnoha kosmetických výrobcích.
Lylal		Bezbarvá olejovitá kapalina, která sladce voní po lilích nebo konvalinkách. Aroma bylo vyrobeno v 60. letech 20. století a jeho působení je dlouhodobé.
Methylheptin karbonát		Bezbarvá, případně lehce nažloutlá kapalina květinové vůně. Vyrábí se synteticky a používá se při výrobě kosmetiky nebo do některých aromat (víno, jahoda).

**Tabulka 7:** Potenciálně alergenní vonné látky [7], [9], [10], [11], [17] – pokračování

Oakmoss extrakt		Výtažek z větvičníku slivového. Má antiseptické vlastnosti a v kosmetice tvoří základ mnoha vůní.
Treemos extrakt		Výtažek z terčovky otrubičnaté vůní připomínající dřevo nebo mořské chaluhy. Má antimikrobiální účinky a používá se především v kosmetice.

## 2.5 Použité metody a experimentální techniky

Stanovení aromatických látek se řadí k obtížným úkolům analytické chemie. Silice mohou obsahovat 200 až 800 individuálních látek rozdílného typu a jejich vnímání je výsledkem interakce mezi chemickými sloučeninami a smysly, chutí a čichem. Z tohoto důvodu by komplexní charakterizace aromatických látek měla být kombinací senzorického hodnocení a chemické instrumentální analýzy. Mezi nejčastěji používané instrumentální metody patří plynová a kapalinová chromatografie. S ohledem na experimentální část je zde věnována pozornost chromatografii plynové, která se v praxi nejčastěji používá v kombinaci s hmotnostní detekcí. Zároveň je popsána metoda SPME (mikroextrakce tuhou fází), která byla použita pro extrakci aromatických látek z matrice vzorků cukrovinek [17].

### 2.5.1 Mikroextrakce tuhou fází

Počátky SPME sahají do 80. let minulého století. V poslední době se používání této techniky dostává do popředí a nachází velmi široké uplatnění. Používá se mimo jiné v oblasti analýzy znečištěného životního prostředí, v léčebné kosmetice, v potravinářství, ale i ve forenzní analýze [25, 29].

Princip metody spočívá v sorpci složky vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které je nejdůležitější součástí zařízení. Vlákno se nachází uvnitř kovové jehly, jež ho chrání před mechanickým poškozením. Jehla nejprve propíchne septum v zátce vialky s matricí a během procesu vzorkování se pak vlákno z jehly pomocí pístu vysune. Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno do jehly zasune zpět a celá jehla se ze vzorkované matrice vytáhne a vloží do nástřikového prostoru chromatografu, kde se vlákno opět vysune [13, 35]. SPME zařízení je uvedeno na Obrázku 2.



**Obrázek 2:** Zařízení pro vzorkování pomocí metody SPME [35]

Spolehlivost a přesnost extrakčního procesu ovlivňuje několik faktorů. Citlivost metody může ovlivnit tloušťka stacionární fáze vlákna. Silnější vrstva může vyextrahovat analytu více než vrstva tenká, a proto se vlákno se silnější vrstvou používá pro zachycení těkavějších látek. Dalším faktorem ovlivňujícím měřicí proces je teplota, neboť zahřev vzorku zkracuje čas potřebný k dosažení rovnováhy a tím i dobu sorpce. V některých případech, například při stanovení méně těkavých sloučenin, je zahřátí dokonce nezbytné. V souvislosti s teplotou je důležité také správné umístění vlákna v injektoru. Během desorpce by se vlákno mělo nacházet v nejteplejším místě [15].

Rychlost reakce závisí také na velikosti plochy mezi maticí a extrakční fází. Zkrátit dobu extrakce může i proces míchání vzorku, zejména v případě molekul s vyšší molekulovou hmotností. Nutno mít však na paměti, že proměnlivé míchání není žádoucí, protože způsobuje nižší opakovatelnost stanovení [15].

Ačkoli je metoda SPME poměrně nenáročná, její citlivost je za rovnovážných podmínek vysoká. Použití metody SPME skýtá navíc i další výhody. Šetří čas, protože umožňuje zkrácení extrakční doby, a minimalizuje i používání organických rozpouštědel. Významným pozitivem je i ekonomická stránka věci, neboť vlákna lze použít opakovaně a kromě toho jsou univerzální pro jakýkoliv typ plynového nebo kapalinového chromatografu [5, 14].

### 2.5.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Plynová chromatografie je definována jako fyzikálně-chemická metoda separace látek ze směsi, která je založená na distribuci mezi dvěma heterogenními fázemi. Jedna fáze je tzv. stacionární (nepohyblivá) a druhá je fáze mobilní (pohyblivá). Pro plynovou chromatografii je cílem zajistit co nejúčinnější separaci, ale je také nutno minimalizovat dobu analýzy. Důležité je dbát i na to, aby separované látky nebyly termolabilní [20].

Jako stacionární fáze může být použita vysoce viskózní, ale málo těkává kapalina a proces je pak nazýván plynová rozdělovací chromatografie (GLC). Pokud je řídicím procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch pevného sorbentu, hovoříme o plynové chromatografii adsorpční (GSC). V praxi se častěji využívá metoda GLC [21].

Mobilní fází je v případě této metody nosný plyn, nejčastěji vodík, dusík, helium, argon nebo oxid uhličitý, který prochází kolonou naplněnou sorbentem. Proudění plynu kolonou zajišťuje rozdíl tlaků na počátku a na konci kolony, kdy na vstupu musí být tlak vyšší než na výstupu, kde je nejčastěji tlak atmosferický. Plyny musí být zbavovány vodních par i jiných nečistot, a tak bývají do potrubí nosného plynu zařazovány sušičky nebo absorbéry kyslíku. Existují však i případy, kdy plyn naopak bývá sycen parami látek, které na koloně vytvoří předsorbovanou vrstvu a tím zvýší účinnost dělení. Průtok plynu je regulován jehlovými ventily a měření tlaku plynu zajišťuje manometr nebo tenzometrické činidlo [30].

Vzorek se do chromatografické kolony vpravuje pomocí dávkovacího zařízení, tzv. injektoru. Dávkuje se buď přímo plynný vzorek, nebo častěji vzorek rozpuštěný v organickém rozpouštědle. Nástřik vzorku se provádí propíchnutím jehly stříkačky pryžovým těsněním a vstříknutím vzorku do předem vyhřátého prostoru injektoru. Po nástřiku dojde okamžitě ke zplynění vzorku a ten je unášen nosným plynem do chromatografické kolony [32].

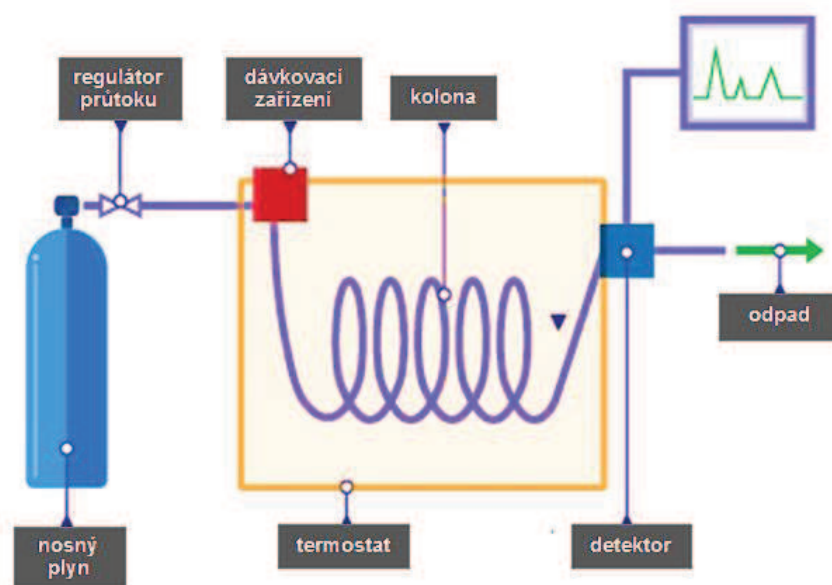
Prvními kolonami byly náplňové kolony se sorbenty nebo nosiči pokrytými stacionární fází. V 50. letech 20. století začaly být používány i kolony kapilární, v nichž mají funkci nosiče stěny kapiláry pokryté kapalnou stacionární fází [30].

Náplňové kolony jsou trubice ze skla nebo nerezové oceli, v nichž jako nosič nejčastěji slouží křemelina, na níž bývá nanесeno 3 až 15 % stacionární fáze. Je také nutno provést tzv. silylaci, která zabrání interakci silanolových skupin Si-OH se vzorkem [32].

Kolony kapilární jsou tenké kapiláry vyrobené z nerezové oceli, skla nebo křemene. Účinnost těchto kolon je mnohonásobně vyšší než v případě kolon náplňových, což umožňuje separaci složitých směsí a také efektivní zkrácení doby analýzy. Podle umístění stacionární fáze rozlišujeme několik typů kapilárních kolon. Nejčastěji jsou používány kolony typu WCOT (Wall Coated Open Tubular), které mají stacionární fázi umístěnou přímo na vnitřní stěně. PLOT (Porous Layer Open Tubular) má na vnitřní stěně nanесenou pórovitou vrstvu o tloušťce 10  $\mu\text{m}$  a více. V případě typu SCOT (Support Coated Open Tubular) je vnitřní porézní vrstva přímo smočena stacionární fází [31].

V koloně probíhá separace vzorku na jednotlivé složky, které postupně z kolony vycházejí a vstupují do detektoru a celá instrumentace je zakončena vyhodnocovacím zařízením. V souvislosti s plynovou chromatografií se využívá několik typů detektorů – hmotnostní, plamenově ionizační, olfaktometrický, detektor elektronového záchytu aj. [22]. Schéma plynového chromatogramu je uvedeno na Obrázku 3.

Nejčastěji využívaným detektorem ve spojení s plynovou chromatografií je detektor hmotnostní (MS). Tento typ detektoru pracuje na principech ionizace a fragmentace sloučeniny nejčastěji skrze elektronovou nebo chemickou ionizaci. Při spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru je však nutno vyřešit tlakovou nekompatibilitu, kdy tlak na výstupu kolony chromatografu je přibližně atmosférický, ale iontové zdroje používané pro tuto metodu pracují optimálně za vysokého nebo za velmi vysokého vakua. Předpokladem je tedy použití dostatečně výkonného čerpacího systému, schopného odčerpávat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace. Výhodou hmotnostních detektorů je jejich vysoká selektivita a také cenová dostupnost [21].



*Obrázek 3: Schéma plynového chromatografu [27]*

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité laboratorní vybavení a chemikálie

##### 3.1.1 Chemikálie (standardy)

Byly použity následující chemikálie a standardy alergenních vonných látek, všechny v čistotě p.a.:

$\alpha$ -Amylcinnamaldehyd	97 %	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -Amylcinnamyl alkohol	$\geq 85$ %	Fluka Analytical
Anýzalkohol	98 %	Sigma-Aldrich
Benzylalkohol	99 %	Alfa Aesar
Benzylbenzoát	99 %	Alfa Aesar
Cinnamaldehyd	$\geq 93$ %	SAFC Supply Solution
Cinnamylalkohol	98 %	Alfa Aesar
Cítral, cis + trans	95 %	Alfa Aesar
Citronellol	96 %	Alfa Aesar
Kumarin	98 %	Alfa Aesar
Eugenol	99 %	Alfa Aesar
Farnesol	95 %	Sigma-Aldrich
Geraniol	97 %	Alfa Aesar
$\alpha$ -Hexylcinnamal	$\geq 95$ %	SAFC Supply Solution
Hydroxycitronellal	$\geq 95$ %	Fluka Analytical
Isoeugenol	98 %	Alfa Aesar
$\alpha$ -Isomethylionon	$\geq 85$ %	Fluka Analytical
Lilial	$\geq 95$ %	Sigma-Aldrich
Limonen	97 %	Alfa Aesar
Linalool	97 %	Alfa Aesar
Lylal	$\geq 97$ %	Sigma-Aldrich
Methyl 2-oktynoát	99 %	Sigma-Aldrich
Heptan	99 %	Sigma-Aldrich

##### 3.1.2 Laboratorní vybavení

###### 3.1.2.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ<sup>TM</sup> LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie



### 3.1.2.2 Plyny

- Helium, čistota 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

### 3.1.2.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$ , Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Mikropipety BiohitProline (100–1000  $\mu\text{m}$ ), špičky
- Vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

## 3.2 Analyzované vzorky

Celkem bylo analyzováno pět náhodně vybraných vzorků želé cukrovinek (želatinoví medvídci) českých i zahraničních výrobců zakoupených v běžné tržní síti. Pro tuto práci byly vybrány dva druhy barev (příchutí): červená (jahoda) a žlutá (citron).

Pro zachování anonymity byly názvy výrobců nahrazeny označením A01 až A05. Složení jednotlivých vzorků (uvedené na obalech výrobku) uvádí Tabulka 8. Vzorky byly skladovány v lednici v původních obalech až do doby analýzy.

Před analýzou byly vzorky gumových medvídků rozkrájeny nožem na kousky o rozměrech přibližně 2x2 mm (Obrázek 4) a umístěny na dno vialek tak, aby během procesu nedošlo ke kontaktu s SPME vláknem. Navážka jednoho vzorku činila 3 g. Vialka byla uzavřena septem a umístěna do autosampleru pro analýzu. Od každé barvy byly proměřeny vždy dva vzorky, celkem tedy bylo proměřeno celkem 20 vzorků.



*Obrázek 4: Příprava vzorku pro analýzu*



**Tabulka 8:** Složení vzorků želé cukrovinek

Vzorek	Složení
A01	Glukózový sirup, cukr, želatina, jablečná šťáva z koncentrátu 5 %, kyseliny (kyselina vinná jablečná, citronová), koncentrát šťávy z černé mrkve, extrakt ze spiruliny, <b>aromata</b> (jahoda, jablko, pomeranč, citrón), leštící směs (rostlinné tuky: palmojadrový, kokosový, leštící látka: karnaubský vosk), regulátor kyselosti (askorban sodný), barviva (paprikový extrakt, karoten, kurkumin).
A02	Glukózový sirup, cukr, jedlá želatina, dextróza, ovocná šťáva z koncentrátu: jablko, jahoda, malina, pomeranč, citron, ananas, kyselina citrónová, ovocné a rostlinné koncentráty: světlice barvířská, řasa spirulina, jablko, černý bez, pomeranč, černý rybíz, kiwi, citron, aronie, mango, mučenka, hroznové víno, aroma, extrakt z černého bezu, leštící látky: včelí vosk bílý a žlutý, karnaubský vosk.
A03	Glukózový sirup, cukr, želatina, voda, kyselina (kyselina citrónová), leštící směs (rostlinný olej kokosový, leštící látka: karnaubský vosk), <b>aromata</b> , barviva (karmíny, kurkumin, měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů, paprikový extrakt), koncentrát (ibíšek, mrkev), rostlinný olej (bambucké máslo).
A04	Glukózový sirup, cukr, želatina, kyseliny (kyselina citrónová a mléčná), barviva (černý bez, hrozny, černý rybíz, mrkev, paprika, kurkuma, kopřiva, špenát), <b>aroma</b> , rostlinný olej (palmový), leštící látka (včelí vosk bílý a žlutý, karnaubský vosk).
A05	Glukózový sirup, cukr, pitná voda, vepřová želatina, regulátor kyselosti (kyselina citrónová), zvlhčující látka (sorbitol), koncentrovaná hroznová šťáva (1,2%), <b>aromata</b> , leštící směs (kokosový olej, leštící látka: karnaubský vosk), extrakt ze světlice barvířské, koncentrát řasy spirulina, koncentrát z černé mrkve, bezinkový koncentrát.

### 3.3 Metoda SPME-GC-MS

Identifikace aromatických a identifikace a kvantifikace potenciálně alergenních aromatických látek v jednotlivých vzorcích byla provedena metodou mikroextrakce pevnou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

#### 3.3.1 Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace (temperování) 10 minut
- Doba extrakce 20 minut
- Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru) 40 °C
- Agitátor zapnutý 5 sekund, vypnutý 60 s
- Množství vzorku 3 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm

#### 3.3.2 Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona TG–WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)
- Teplota injektoru (desorpce) 240 °C
- Doba desorpce 20 minut
- Dávkování splitless, ventil uzavřen 10 minut
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm
- Nosný plyn helium, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>
- Teplotní program 40 °C s výdrží 2 min., vzestupný gradient 3 °C/min. do 110 °C s výdrží 10 min., vzestupný gradient 3 °C/min. do 200 °C s výdrží 0 min., celková doba analýzy 65 min.
- Hmotnostní detektor v modu EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30–370 amu, rychlost skenování 0,2 s

#### 3.3.3 Vyhodnocení výsledků SPME-GC-MS analýzy

##### 3.3.3.1 Příprava kalibračních přímk standardů

Jednotlivé standardy byly rozpuštěny ve vodě nebo v methanolu a postupně ředěny na příslušné koncentrace, které byly proměřovány. Z každého standardu bylo připraveno min. 5 různých koncentrací a analyzováno za stejných experimentálních podmínek jako vzorky (kap. 3.3).

### 3.3.3.2 Identifikace a kvantifikace aromaticky aktivních látek ve vzorcích

Vyextrahované AAL byly kvantifikovány na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Výsledná koncentrace u potenciálně alergenních AAL byla vypočítána pomocí vztahu:

$$c_{\text{vzorek}} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \quad (1)$$

kde A je plocha píku a c je koncentrace v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (resp.  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

## 3.4 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2007. Každý vzorek byl změřen dvakrát, výsledky jsou vyjádřeny ve tvaru průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (n=2).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je pilotní částí studie, která se bude zabývat studiem senzorické kvality nečokoládových cukrovinek se zaměřením na chuť a vůni a s nimi související obsah AAL. Podstatou této bakalářské práce je identifikace AAL vybraných druhů nečokoládových cukrovinek.

Jako modelové vzorky byly vybrány cukrovinky typu želé (želatinoví medvídci), u nás velmi oblíbené, konkrétně dva druhy barev (příchutí) od pěti výrobců: červená (jahoda) a žlutá (citron). Hlavním cílem bylo posoudit rozdíly v obsahu AAL mezi vzorky stejného typu od různých výrobců.

Želé cukrovinky jsou podle legislativy definovány jako „cukrovinky s konzistencí gelu, vzniklou přidavkem želírujících látek, zejména pektinu, agaru, škrobu nebo želatiny“ [1]. Na trhu je dostupný široký sortiment produktů od tuzemských i zahraničních výrobců, různých barev, tvarů a příchutí. Jejich kvalita tkví hlavně v senzorické aktivitě, proto se také při jejich výrobě používá široké spektrum různých typů tzv. „aromat“, podle legislativy nazývaných „aromatické přípravky“ [4], což jsou zjednodušeně řečeno směsi mnoha různých AAL používané v praxi k aromatizaci potravin, resp. pochutin; bližší charakterizaci uvádí kap 2.4. Potravinářská legislativa povoluje označit jejich přidavek do potraviny/pochutiny jednoduchým údajem „aroma“ nebo „aromatizováno“ na obalu výrobku. Problém je, že vzhledem k často ne přesně definovanému složení mohou obsahovat výrobky některé AAL klasifikované jako potenciálně alergenní.

Dalším cílem této práce tedy bylo kvantifikovat alergenní AAL ve vzorcích a posoudit jejich možné negativní účinky při konzumaci. Pro stanovení AAL, alergenních i nealergenních, byla zvolena metoda SPME-GC-MS. Podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.3.

### 4.1 Identifikace aromaticky aktivních látek ve vzorcích

Identifikace těkavých látek byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Získané chromatogramy jsou pro ilustraci uvedeny v Přílohách 1-10.

V Tabulce 9 je uveden přehled všech těkavých látek identifikovaných ve všech vzorcích. Hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v %. Vzhledem k mírným odchylkám retenčních časů ( $t_R$ ) je uveden vždy průměr a relativní směrodatná odchylka (RSD) ze všech měřených vzorků, která se pohybovala většinou v hodnotách  $< 1 \%$ , což lze považovat za výbornou reprodukovatelnost.

Naše výsledky byly porovnány s některými dostupnými publikacemi [17, 37]. Látky označené symbolem \*\* byly v těchto studiích prokázány jako aromaticky aktivní, látky s označením \* jsou pravděpodobně aromaticky aktivní, ale ověřené zdroje pro ně nebyly nalezeny. Tučně jsou vyznačeny potenciálně alergenní AAL.

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek

Látka	**/*	t <sub>R</sub> [min]	RSD [%]	A01		A02		A03		A04		A05	
				červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý
ethylacetát	**	3,93	0,48	58	-	-	-	-	-	-	-	53,8	-
methanol		4,08	0,23	-	-	74,3	82,2	-	55,0	70,4	73,8	-	-
2-hydrazinoethanol		4,83	0,21	-	-	-	-	-	-	-	59,9	-	63,9
propanamid		4,84	0,01	60,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ethanol		4,84	0,22	-	-	54,8	65,6	-	72,7	48,7	-	52,4	-
isopropanol		4,86	0,01	-	-	-	-	60,2	-	-	-	-	-
propylacetát	**	5,80	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	49,3	53,9
methylbutyrát	**	6,10	0,23	-	-	-	89,9	-	-	-	-	-	-
isobutylacetát	**	6,83	0,01	-	-	67,0	-	-	-	-	-	-	-
α-pinen	**	6,91	0,33	-	14,5	-	23,9	-	-	-	36,2	-	16,2
ethylbutyrát	**	7,58	0,35	52,5	74,9	53,7	-	48,6	59,6	78,1	-	65,4	53,4
ethyl-2-methylbutyrát	**	8,01	1,76	96,5		97,5	-	91,8		95,8	-	95,2	92,9
kamfen	**	8,29	0,01	-	39,8	-	-	-	-	-	-	-	-
ethylisovalerát	**	8,61	0,01	-	-	-	-	-	-	92,4	-	-	-
butylacetát	**	8,78	0,28	-	-	-	-	-	49,2	-	-	60,4	50,3
hexanal	**	9,19	0,01	-	-	-	-	-	-	73,1	-	-	-
isobutanol	**	9,46	0,32	-	-	-	-	61,5	-	-	-	-	-
β-pinen	**	9,90	0,79	-	22,7	-	22,7	-	-	-	35,9	-	27
2-propenol		10,33	0,01	-	-	-	-	58,6	-	-	-	-	-
1,5-hexadien-3-ol		10,38	0,01	-	-	-	-	-	36,2	-	-	-	-
sabinen	**	10,45	0,34	-	41,6	-	42,1	-	-	-	50,3	-	34
isoamylacetát (banánový olej)	**	10,67	0,23	82,9	-	70,6	-	75,4	79,2	74,2	-	90,3	-
ethylpentanoát		11,15	0,19	-	-	53,5	-	56,3	54,9	-	-	-	-
butan-1-ol	**	11,50	0,16	-	-	61,4	58,2	-	-	68,9	-	56	51,9

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

myrcenol	*	12,28	0,01	-	-	-	-	52,7	-	-	-	-	-
myrcen	**	12,29	0,32	-	63,6	-	61,4	52,1	50,5	29,0	65,6	32,1	74,1
1-ethoxy-2-propanol		12,30	0,08	-	-	62,0	-	-	-	76,9	-	-	-
heptan-2-on	**	13,10	0,20	-	-	-	-	51,7	72,8	-	-	-	-
heptanal	**	13,24	0,12	-	-	68,4	-	-	-	50,5	-	-	-
isoamyl isobutyrate		13,48	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	61,3	-
<b>D-limonen</b>	<b>**</b>	<b>13,69</b>	<b>0,64</b>	<b>39,0</b>	<b>52,6</b>	<b>40,6</b>	<b>58,2</b>	<b>46</b>	<b>55,6</b>	<b>44,8</b>	<b>54,0</b>	<b>47,4</b>	<b>52,6</b>
3-methylbutanol		14,10	0,15	53,1	-	47,0	-	50,4	34,9	50,0	-	42,1	-
eukalyptol		14,05	0,86	-	67,3	-	-	-	-	-	-	87,5	-
fellandren	**	14,42	2,40	-	61,6	-	-	-	-	-	25,5	-	-
1,2,3,4-tetramethylbenzen		14,41	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,8
trans-2-hexenal	**	14,68	0,29	-	-	-	-	45,7	-	-	-	-	-
1-ethyl-4-methylbenzen		14,90	0,05	-	-	-	-	-	-	25,4	-	-	-
ethylhexanoate	**	15,26	0,30	47,3	62,6	-	61,0	54,1	61,4	51,8	-	54,0	63,3
$\gamma$ -terpinen	**	15,71	0,43	-	33,4	-	34,6	-	29,8	-	28,2	24,5	29,9
mesitylen		15,70	0,09	-	-	-	-	-	-	30,7	-	-	-
bicyclo[2.2.2]oct-5-en-2-ol		15,99	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75,0
cis-ocimen	**	16,09	0,40	-	-	-	-	-	-	-	20,8	-	-
bicyclo[3.2.1]octan-2-one		16,05	0,01	-	24,4	-	-	-	-	-	-	-	-
3-methylbutylbutyrate		16,55	0,01	-	-	64,1	-	-	-	-	-	-	-
1-isopropenyl-4-methylcyklohexan		16,56	0,01	-	34,9	-	-	-	-	-	-	-	-
isoamylbutyrate		16,57	0,04	-	-	-	-	-	33,6	39,5	-	-	-
benzocyklobutan		16,59	0,01	-	-	-	-	31,2	-	-	-	-	-
o-cymen		16,83	0,21	-	23,9	-	27,3	-	-	-	20,8	-	22,6
hexylacetate	**	16,93	0,12	-	-	80,5	-	63,9	85,9	85,6	-	89,4	-
2-benzyl-2-methyl-1,3-dithiolan		17,11	0,25	-	-	-	-	-	-	-	40,0	-	-

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

(+)-4-karen		17,27	0,12	-	-	-	22,2	-	-	-	-	-	18,5
pentamethylcyklopentadien		17,31	0,01	-	-	-	-	-	-	-	15,8	-	-
terpinolen	**	17,32	0,21	-	17,7	-	21,9	-	21,3	-	15,3	-	-
cyklooktanol		17,64	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	29,6	-
oktanal	**	17,68	0,17	52,6	59,6	74,6	55,9	62,1	70,3	-	57,8	70,3	64,1
isoamylvalerát	**	17,79	0,05	-	-	-	-	-	64,7	56,8	-	-	-
4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien		18,43	0,15	-	-	-	-	-	-	-	56,4	-	-
3-hexenylacetát	**	18,90	0,05	-	26,5	-	-	-	36,8	33,7	-	-	-
4-hexen-1-yl-acetát		18,92	0,16	29,8	21,8	22,6	-	40,9	-	-	-	-	-
4-methyl-2-pentyl-1,3-dioxolan 1		19,02	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	60,8	56,1
1-butoxy-2-propanol		19,78	0,01	-	-	39,4	-	-	-	-	-	-	-
2-methyl-2-hepten-6-on		19,80	0,04	-	-	-	-	-	82,9	-	-	-	-
ethylheptanoát	**	19,55	0,11	56,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-hydroxycinenol		19,80	0,07	-	23,2	-	28,1	-	-	-	-	-	-
6-methyl-5-hepten-2-on		19,80	0,15	-	-	75,1	65,7	82,6	-	-	-	61,1	63,7
2-ethyl-4-methyl-1,3-thiazol		19,97	0,07	-	-	-	-	-	-	84,5	74,0	-	-
4-methyl-2-pentyl-1,3-dioxolan 2		20,04	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	69,2	44,8
ethylaktát	**	20,19	1,61	-	-	61,8	63,8	-	-	37,6	51,3	-	-
2-isopropyl-4-methylthiazol		20,26	0,01	-	-	-	-	-	95,9	-	-	-	-
1-hexanol	**	20,40	0,17	43,2	50,3	42,5	45,8	40,3	44,3	43,3	45,9	44,5	47,4
safranal	**	20,77	0,10	-	-	-	32,4	-	-	-	-	-	36,4
trans-3-hexen-1-ol	**	20,89	0,07	45,7	21,9	-	-	36,0	26,6	26,5	28,2	-	-
ethyl 4-(ethyloxy)-2-oxobut-3-enoát		21,22	0,01	-	-	32,7	-	-	-	-	-	-	-
allylhexanoát	**	21,23	0,13	-	-	80,1	78,3	86,7	89,1	-	-	-	-
myrtenyl methyl ether		21,42	0,14	-	-	-	88,7	-	-	-	-	87,0	-
4-oktanol		21,63	0,01	-	-	-	-	57,6	-	-	-	-	-

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

cis-3-hexen-1-ol	**	21,78	0,16	42,7	48,4	33,9	25,7	23,2	42,2	38,4	24,6	25,0	34,8
3-oktanol	**	22,08	0,01	-	-	-	-	74,7	-	-	-	-	-
methyloktanoát	**	21,96	0,01	-	-	-	84,8	-	-	-	-	-	-
nonanal	**	22,17	0,09	55,3	42,6	70,6	60,9	-	67,4	42,2	64,2	49,3	-
2-isobutoxyethanol		22,45	0,01	-	-	36,4		-	-	-	-	-	-
2-butoxyethanol		22,48	0,01	-	-	-	-	-	-	56,4	-	-	-
3-methyl-2-[(2E)-2-methyl-2-buten-1-yl]furan		22,59	0,05	-	36,8	-	46,4	-	-	-	-	-	-
3-methyl-2-(3-methyl-2-buten-1-yl)furan		22,60	0,03	-	-	-	45,6	-	-	-	52,0	-	-
$\alpha$ -isomethylionon	**	22,60	0,01	-	20,7	-	-	-	-	-	-	-	-
2-hexenol	**	22,72	0,04	-	-	46,6	50,1	-	43,1	45,7	54,0	-	-
cis-myroxide	*	22,88	0,03	-	-	-	-	-	-	-	53,2	-	-
4-hexenol		22,95	0,01	-	-	-	-	-	18,1	-	-	-	-
3-methylcyklopenten		22,98	0,01	-	-	-	-	42,5	-	-	-	-	-
o-methylanisol	**	22,99	0,01	-	55,1	-	-	-	-	-	-	-	-
3-(4-methyl-3-penten-1-yl)furan		23,33	0,04	-	84,2	-	95,4	-	-	-	96,1	-	-
ethyl-oktanoát	**	23,72	1,35	64,0	-	79,7	58,0	-	60,4	61,5	68,0	-	-
ethyl-6-heptanoát		23,82	0,01	-	49,6	-	-	-	-	-	-	-	-
p-cymen	**	24,07	0,11	-	19,4	-	22,7	-	-	-	23,4	-	18,3
Linalooloxid	**	24,12	0,07	-	-	-	-	42,2	46,2	-		-	-
cis-limonenoxid		24,30	0,03	-	-	-	-	-	-	-	53,2	-	-
1,2-dimethyl-4-vinylbenzen		24,72	0,01	-	-	-	32,2	-	-	-	-	-	-
heptylformiát		24,73	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	32,1	-
heptanol	**	24,73	0,11	-	-	33,1	-	60,1	-	-	-	-	-
trans-limonenoxid		24,81	0,08	-	56,6	-	56,4	-	-	-	48,2	-	54,3
kyselina octová	**	25,17	0,24	51,5	50,8	52,9	-	-	58,1	66,0	53,4	63,7	50,5



**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

furfural		25,39	0,08	52,6	54,9	72,0	67,5	67,8	-	69,5	59,9	62,8	67,9
oktylacetát	**	25,55	0,06	-	-	-	51,3	-	-	-	71,2	-	-
2-propyl-2-heptenal		25,64	0,01	-	-	57,3	-	-	-	-	-	-	-
citronellal	**	25,79	0,09	-	43,8		47,4	-	-	-	50,6	42,0	-
1-(2-Methoxy-1-methylethoxy)-2-propanol		25,87	0,01	-	-	60,2	-	-	-	-	-	-	-
2-ethyl-1-hexanol		26,19	0,05	29,1	-	33,7	16,6	31,1	35,5	42,9	-	-	-
dekanal	**	26,63	0,10	60,8	77,8	73	75,1	66,6	70,2	59,5	77,2	33,2	62,5
1-(2-furanyl)-ethanon	**	27,15	0,10	77,0	69,0	61,4	-	68,7	80,1	-	-	-	70,4
1-(2-furanyl)-1-pentanon		27,17	0,06	-	70,2	60,2	-	-	-	-	-	-	-
D-kamfor		27,32	0,05	-	-	-	-	41,2	59,6	-	-	-	-
1,2-diacetoxyprom		27,53	0,01	-	-	-	-	95,5	-	-	-	-	-
ethyl-3-hydroxybutyrát		27,65	0,13	-	-	-	-	88,0	93,8	-	-	-	-
1-(2-Methoxypropoxy)-2-propanol		27,81	0,05	-	-	45,6	-	-	-	-	-	-	-
benzaldehyd	**	28,06	0,19	46,6	-	48,4	40,9	45,5	46,4	49,3	33,6	50,9	46,0
3,3,6,6-Tetramethyl-1,4-cyklohexadien		28,06	0,03	-	48,3	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-butandiol 1		28,81	0,02	-	-	-	-	-	-	58,6	-	-	-
3-pinanon		28,90	0,25		-	-	51,8	-	-	-	-	50,7	-
linalool	**	29,17	0,11	55,4	55,5	52,6	51,5	48,6	51,5	48,1	50,8	50,0	47,6
propanová kyselina		29,49	0,16	-	-	53,5	-	-	-	60,2	-	-	75,5
linalylacetát	**	29,65	0,10	-	67,5	-	-	-	20,3	-	-	-	-
1-oktanol	*	29,67	0,10	27,4	-	25,2	21,4	39,0	10,7	-	22,4	11,7	18,2
pinocarvone	*	30,22	0,05	-	83,0	-	-	-	-	-	-	-	88,7
ethyl-3-(methylsulfanyl)propanoát		30,38	0,05	-	-	95,3	85,4	-	-	-	-	-	-
isopulegol	**	30,43	0,01	-	-	-	-	-	-	-	37,5	-	-
dimethylsulfoxid		30,57	0,07	-	-	-	54,0	-	-	-	-	68,8	-

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

2-hydroxypropylacetát		30,89	0,08	-	-	88,9	-	82,5	-	93,4	-	-	-
4-terpineol 1	**	30,78	0,06	38,5	44,1	-	-	-	-	-	-	-	-
isogeranial		30,75	0,08	-	-	-	40,6	-	-	-	46,6	-	31,8
$\alpha$ -bergamoten	*	31,08	0,22	-	23,8	-	-	-	-	-	-	-	31,1
2,3-butandiol 2		31,07	0,02	-	-	-	-	-	-	41,0	51,7	-	-
diethylmalonát	**	31,24	0,10	-	-	-	-	89,9	86,2	-	-	-	-
fenchol	**	31,29	0,14	47,2	59,2	-	-	-	-	-	-	-	73,9
2-methylpropanová kyselina		31,40	0,03	-	-	-	-	-	-	37,7	-	-	-
karyofylen	**	31,71	0,16	-	36,3	-	22	-	-	-	25,8	23,1	38,1
propylenglykol		32,06	0,12	59,7	-	48,5	57,8	45,8	63,1	48,5	62,6	63,4	67,1
3-methylkamfeniol		32,13	0,02	-	62,4	-	-	-	-	-	-	-	-
4-terpineol 2	**	32,50	0,09	60,3	66,1	49,2	55,1	50,5	47,8	53,0	62,8	58,6	71,8
5-pentylcyklohexa-1,3-dien		33,36	0,01	-	-	-	30,0	-	-	-	-	-	-
ethyllevulát		33,46	0,24	-	-	-	-	98,1	98,1	-	-	-	-
(methylsulfonyl)methan		33,58	0,01	-	-	-	83,9	-	-	-	-	-	-
ethyl-(2,4-dimethyl-1,3-dioxolan-2-yl)acetát		33,96	0,01	-	-	-	-	-	-	96,9	76,7	-	-
1-hydroxy-2-propanyl acetát		33,97	0,01	-	-	86,0	39,7	-	-	-	-	-	-
myrtenal		34,30	0,04	-	70,1	-	-	-	-	-	-	-	-
4-isopropenyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol		34,53	0,11	68,6	-	-	39,7	-	67,9	47,5	65,6	37,0	-
$\beta$ -terpineol		34,72	0,11	57,4	-	-	67,8	65,3	50,7	-	-	-	65,4
N,N,3-trimethyl-2-pyridinamin		34,77	0,01	-	48,9	-	-	-	-	-	-	-	-
5-isopropenyl-2-methylcyklohexanol	**	34,80	0,01	-	-	-	-	-	-	-	29,8	-	-
ethyldekanoát	**	35,25	0,06	-	-	-	71,7	-	-	-	70,1	42,3	-
menthol	**	35,39	0,01	-	-	26,6	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

ethoxybenzen		35,80	0,01	-	53,0	-	-	-	-	-	-	-	-
dimethyl-2-methylpentandioát		36,01	0,01	-	-	-	31,5	-	-	-	-	-	-
butanová kyselina		35,98	0,12	62,9	-	65,3	-	55,5	52,2	52,0	43,8	45,4	58,1
(Z)-3-hexenylhexanoát		36,70	0,04	64,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6-dimethyl-2,6-oktadien		37,19	0,01	-	-	-	-	-	26,2	-	-	-	-
1-nonanol	**	37,24	0,02	-	-	-	-	-	-	-	23,6	-	-
dihydrocitronellol	**	37,32	0,01	-	-	-	21,2	-	-	-	-	-	-
2,7-dimethyl-1-oktanol		37,39	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	20,5	-
2-furanmethanol		37,74	1,21	80,6	58,8	80,2	-	76,9	80,3	72,4	71,2	75,6	76,3
Butoxypolypropylen glykol		38,13	0,01	-	-	87,4	-	-	-	-	-	-	-
methyl-2-oxobutyát		38,24	0,01	-	-	-	-	-	-	32,1	-	-	-
verbenol	**	38,55	0,01	-	-	-	-	-	38,6	-	-	-	-
<b>citral 1</b>	<b>**</b>	<b>38,62</b>	<b>0,21</b>	<b>22,9</b>	-	<b>48,1</b>	<b>71,2</b>	<b>57,2</b>	<b>40,1</b>	<b>46,3</b>	<b>71,7</b>	<b>60,1</b>	<b>71,8</b>
isopentanová kyselina		38,94	0,27	-	-	-	-	15,8	50,0	-	-	38,0	-
cis-karveol 1	**	39,04	0,04	-	21,7	-	-	-	-	-	16,8	-	-
dimethyl 2-methylpentadioát		39,37	0,03	-	-	92	94,6	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -terpineol	**	39,66	0,13	60,7	43,6	63,1	55,1	44,3	54,7	42,9	54,6	43,5	47,5
gardeniol	**	40,09	0,13	-	-	-	-	71,7	69,6	60,3	-	-	-
2,3-diethyl-5-methylpyrazin		40,09	0,01	-	-	-	61,1	-	-	-	-	-	-
methylisobutyát	**	40,65	0,02	-	-	55,6	-	-	-	-	-	-	-
bisabolen	**	41,32	0,14	-	41,1	-	-	-	-	-	-	-	-
karvon	**	41,62	0,07	37,9	-	57,1	-	-	-	-	40,4	33,5	-
benzylacetát	**	41,73	0,1	-	-	-	-	89,0	-	-	-	-	-
<b>citral 2</b>	<b>**</b>	<b>41,88</b>	<b>0,24</b>	<b>76,7</b>	<b>72,8</b>	<b>55,8</b>	<b>76,3</b>	-	<b>66,1</b>	<b>48,7</b>	<b>76,6</b>	<b>60,1</b>	<b>76,3</b>
ethyl-3-(2,4-dimethyl-1,3-dioxolan-2-yl)propanoát		42,05	0,06	-	-	-	-	94,3	93,4	-	-	-	-
2-piperidinylmethanamin		42,62	0,01	-	-	-	34,2	-	-	-	-	-	47,4

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

cis-isopiperitenol		42,74	0,31	56,0	-	-	-	-	-	24,5	52,6	37,3	-
trans-isopiperitenol		42,95	0,07	51,5	30,8	-	38,7	-	42,1	-	38,7	41,2	43,0
geranylacetát		43,29	0,03	-	31,7	-	-	-	-	-	-	-	19,5
pentanová kyselina 1		43,22	0,33	-	-	70,2	-	-	37,5	66,1	-	-	-
dekanol	**	43,65	0,02	-	-	-	-	16,7	-	-	40,6	-	-
<b>citronellol</b>	<b>**</b>	<b>43,88</b>	<b>0,05</b>	<b>36,3</b>	<b>27,9</b>	<b>24,2</b>	<b>53,1</b>	<b>21,3</b>	<b>39,9</b>	<b>29,1</b>	<b>27,2</b>	<b>35,4</b>	<b>35,5</b>
p-acetyltoluen	**	44,07	0,03	-	21,8	-	-	-	-	-	-	-	-
perillal		44,39	0,06	44,5	-	-	43,6	45	40,9	-	64,8	30,5	42,0
benzylisobutyřát	**	44,56	0,01	-	-	-	-	58,4	70,2	-	-	-	-
fellandren	**	44,60	0,05	76,2	-	64,6	74,7	35,6	57,4	62,5	83,2	67,6	63,5
1-(2-butoxyethoxy)ethanol		45,08	0,01	-	-	56,4	-	-	46,6	-	-	-	-
myrtenol		45,04	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	29,5	30,1
2-(2-butoxyethoxy)ethanol		45,09	0,02	54,0	-	-	-	-	-	46,2	-	-	-
p-mentha-1(7),8-dien-2-ol		45,33	0,05	27,4	-	-	-	-	56,5		27,2	-	46,6
methyldekanoát	**	45,52	0,01	-	-	41,0	-	-	-	-	-	-	-
2-tridekanon		45,84	0,03	-	-	59,7	55,1	-	-	-	-	-	-
β-damascenon	**	46,10	0,34	-	-	-	-	80,9	79,8	53,4	41,3	-	-
1-fenylethanol	**	46,28	0,02	-	-	-	-	30,3	40,1	-	-	-	-
2-hydroxypinokamfon		46,70	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	53,6	-
anethol	**	46,83	0,01	-	-	-	-	36,5	-	-	-	-	-
isopropylaurát		47,00	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	76,3	-
cis-karveol 2	**	47,23	0,03	-	-	-	-	52,6	67,8	58,2	75,6	66,6	73,0
ethyldekanoát	**	47,45	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	51,6	40,8
4,7-dimethyl-1-benzofuran		47,49	0,01	-	-	-	34,3	-	-	-	-	-	-
α-methylcinnamal		47,49	0,01	-	18,1	-	-	-	-	-	39,7	-	-
α-methyljonon	**	47,54	0,01	-	-	-	-	29,0	-	-	-	-	-

**Tabulka 9:** Těkávé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

4-(2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-penten-2-on		47,56	0,06	-	-	45,5	-	-	-	44,3	-	-	-
$\alpha$ -jonon	**	47,66	0,04	-	-	-	-	52,0	54,5	-	-	-	-
<b>geraniol</b>	<b>**</b>	<b>47,91</b>	<b>0,04</b>	<b>44,7</b>	<b>27,0</b>	<b>-</b>	<b>35,4</b>	<b>49,4</b>	<b>46,15</b>	<b>29,1</b>	<b>42,5</b>	<b>-</b>	<b>59,95</b>
hexanová kyselina	**	48,36	0,22	65,4	-	55,0	41,3	50,9	52,4	57,3	36,6	50,2	45,8
pentanová kyselina 2		48,49	0,01	-	68,8	-	-	-	-	-	-	-	-
karveol	**	48,62	0,04	39,0	-	-	46,1	-	-	-	60,0	48,1	63,4
benzylalkohol	**	49,21	0,04	41,3	-	43,1	40,6	46,8	46,2	45,8	46,3	55,8	42,7
3-merkaptohexanol		49,64	0,03	-	-	-	-	-	30,6	-	-	-	-
fenylethanol	**	50,61	0,05	67,0	-	-	-	81,9	-	68,7	-	15,2	73,4
$\gamma$ -oktanolakton	**	50,68	0,01	-	-	-	-	52,3	83,3	80,8	74,3	-	-
butylhydroxytoluen		50,68	0,04	-	-	83,2	80,0	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -jonon	**	51,46	0,03	-	-	45,8	32,2	-	47,5	-	-	-	-
2-hydroxy-3-pinanon		52,28	0,01	-	-	-	92,3	-	-	-	-	-	-
6-methyl-7-okten-2-on		52,34	0,01	-	-	-	-	-	-	-	62,8	-	-
2-ethylhexanová kyselina		52,5	0,54	77,9		72,2	-	83,7	45,5	62,1	80,0	58,2	75,2
heptanová kyselina	**	52,84	0,10	54,6	32,8	70,6	53,7	60,9	60,5	80,4	38,3	-	-
1,1-diisobutoxy-isobutan		53,35	0,01	32,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-furandikarboxaldehyd		53,59	0,01	90,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perillylacetát		51,06	8,06	-	-	-	-	56,4	-	-	-	-	-
2-(4-methylenecyclohexyl)-2-propen-1-ol	**	53,96	0,03	-	-	-	49,5	-	-	-	36,3	-	-
$\gamma$ -nonalakton	**	55,08	0,03	-	-	62,6	-	76,7	73,5	63,3	48,8	-	-
isopropyl-12-methyltridekanoát		55,26	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	63,8	-
isopropylmyristát	**	55,30	0,01	-	23,8	-	-	-	-	-	70,0	-	-
furaneol	**	55,42	0,32	-	-	60,4	-	-	-	64,5	-	-	-
oktanová kyselina	**	56,76	0,05	45,3	75,8	48,3	63,9	55,7	50,1	57,5	61,8	-	-

**Tabulka 9:** Těkavé aromatické látky identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek – pokračování

methylcinnamát	**	56,89	0,02	51,8	63,3	-	-	-	-	44,9	47,0	48,0	-
1,2-diacetin	**	57,14	0,74	53,1	63,8	62,2	52,8	58,0	52,9	-	62,0	-	49,0
triacetin	**	57,09	0,06	58,8	-	-	-	-	49,9	-	36,1	52,5	-
2,6-ditert-butyl-4-hydroxy-4-methyl-1-cyclohexa-2,5-dienone		57,73	0,02	-	-	62,2	60,1	-	-	-	-	-	-
2,6-dimethyl-2,6-oktadien-1,8-diol		59,09	0,02	-	-		23,3	-	-	-	-	-	15,8
2-fenoxyethanol		59,17	0,01	-	-	56,9	-	-	-	-	-	-	-
γ-dekalakton	**	59,16	0,01	-	-	-	-	83,0	80,0	81,0	77,4	-	-
5-hexyldihydro-2(3H)-furanon		59,16	0,05	81,1	65,6	-	-	-	-	-	-	42,3	-
<b>eugenol</b>	<b>**</b>	<b>60,05</b>	<b>0,03</b>	<b>23,4</b>	<b>20,6</b>	<b>24,6</b>	<b>19,9</b>	<b>16,6</b>	<b>20,1</b>	<b>22,2</b>	<b>22,2</b>	<b>29,0</b>	<b>24,4</b>
nonanová kyselina	**	60,36	0,03	84,9	89,4	74,1	-	82,4	84,7	74,5	61,8	-	-
δ-dekalakton	**	60,76	0,03	-	-	-	-	-	74,8	41,5	16,9	-	-
2,6-diisopropylnaftalen		60,81	0,01	83,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-isopropyl-2-methylfenol		61,65	0,01	-	38,9	-	-	-	-	-	-	-	-
5-hydroxymethylfurfural		62,09	0,01	64,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-dihydroxypropylacetát		62,12	0,34	78,2	48,0	75,5	-	76,3	80,1	-	-	77,6	79,3
γ-undekalakton	**	62,79	0,31	75,4	-	63,2	-	58,0	-	15,8	43,3	-	-
(6S)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)-2-hepten-4-on		62,68	0,01	-	-	-	-	80,1	-	-	81,9	-	-
3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-on		63,00	0,01	91,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
limonen-1,2-diol		63,37	0,04	-	84,0	-	-	-	-	-	91,0	-	83,7
hydrokumarin	**	63,52	0,01	-	-	-	-	-	43,9	-	-	-	-
n-dekanová kyselina	**	63,68	0,02	76,9	65,0	-	-	85,8	79,9	43,8	81,2	-	-
geraniová kyselina	**	64,29	0,01	-	34,2	-	-	-	-	-	-	-	-
vanilin	**	65,32	0,01	51,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 246 sloučenin, z toho 30 uhlovodíků, 66 alkoholů, 7 etherů, 20 aldehydů, 24 ketonů, 56 esterů, 13 karboxylových kyselin, 3 fenoly, 16 heterocyklických sloučenin, 6 laktonů a 5 sloučenin, které byly zařazeny mezi ostatní, jelikož neodpovídaly ani jedné skupině (jednalo se o linalooloxid, methylsulfonylmethan, dimethylsulfoxid, 1,1-diisobutoxy-isobutan a propanamid).

Sloučeniny, které byly identifikovány ve vzorcích vícekrát, ale v různých retenčních časech, byly pro lepší přehlednost označeny čísly (např. citral 1, citral 2).

#### **4.1.1 Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích od různých výrobců**

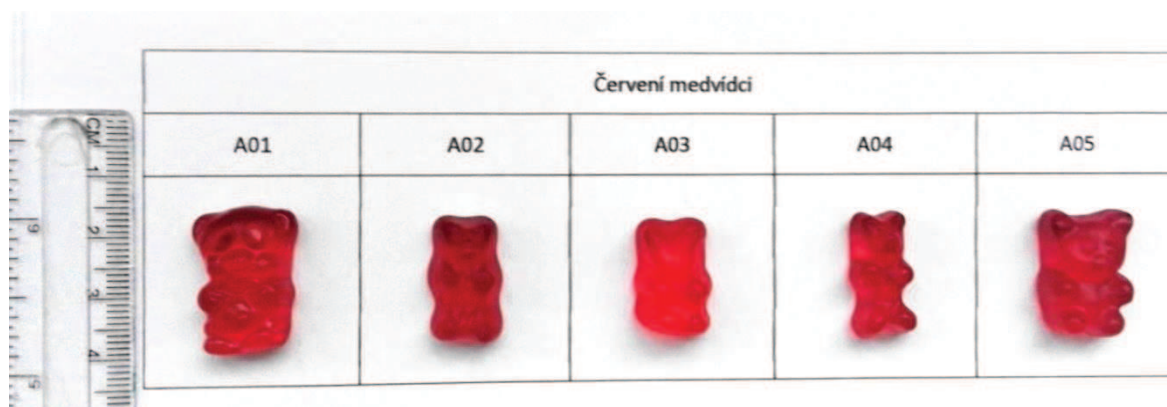
Hlavním cílem této práce bylo posoudit rozdíly v obsahu AAL mezi vzorky stejného typu od různých výrobců. Obsah jednotlivých skupin AAL shrnují Tabulky 11 a 12.

Jak je patrné, jednotlivé vzorky se v závislosti na výrobcí a typu příchutě lišily v počtu a typu těkavých sloučenin. Vyšší počet sloučenin byl nalezen ve vzorcích A02, A03 a A04. S výjimkou vzorku A05 bylo ve žlutých vzorcích identifikováno vždy více sloučenin než v červených vzorcích. Vzhledem k tomu, že zatím nebyly k dispozici veškeré potřebné standardy, obsah těkavých látek ve vzorcích byl sledován pouze z hlediska kvalitativního. Je jasné, že mnohem zajímavější bude stanovení kvantitativní, proto bude následující práce zaměřena především na výběr a ověření vhodné metody kvantifikace. V rámci této práce byly kvantifikovány pouze alergenní AAL jednoduchou metodou vnějšího standardu (viz následující kap. 4.2.).

Jak již bylo zmíněno, další experimenty budou zaměřeny na zkoumání celkové senzorické kvality vybraných vzorků. Zkoumané želatinové cukrovinky se samozřejmě neliší pouze obsahem těkavých látek, tj. chutí a vůní, ale i ostatními senzorickými vlastnostmi. Pro posouzení odlišností ve vzhledu a velikosti vzorků jednotlivých výrobců slouží Obrázky 5 a 6.

**Tabulka 11:** Těkavé látky podle chemických skupin identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek (červená/jahoda)

	A01	A02	A03	A04	A05
uhlovodíky	2	2	5	5	5
alkoholy	23	25	25	25	23
ethery	0	0	1	0	2
aldehydy	10	9	7	8	8
ketony	4	8	7	2	5
estery	13	18	21	16	17
karboxylové kyseliny	8	9	8	11	5
fenoly	1	2	1	1	1
heterocykly	0	1	0	2	2
laktony	1	2	3	4	0
ostatní	2	0	1	0	0
celkem	64	76	79	74	68

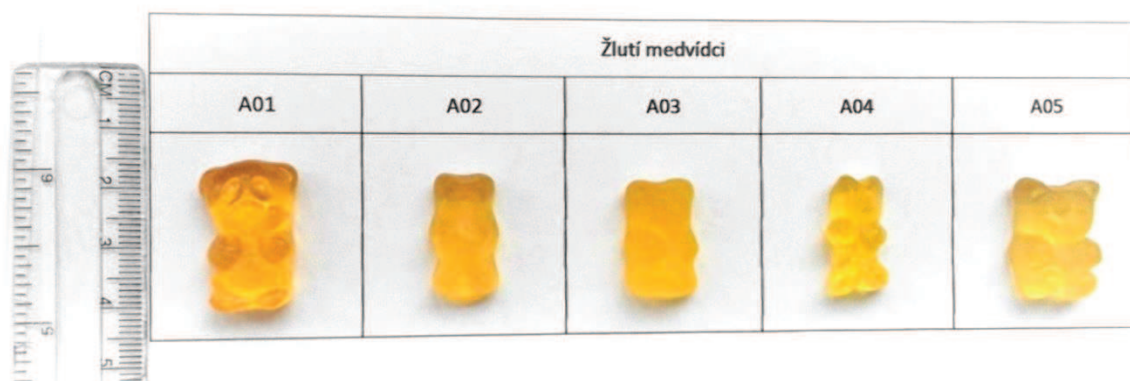


**Obrázek 5:** Vzhled želatinových cukrovinek jednotlivých výrobců (červená/jahoda)



**Tabulka 12:** Těkavé látky podle chemických skupin identifikované v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek (žlutá/citron)

	A01	A02	A03	A04	A05
uhlovodíky	15	15	6	15	11
alkoholy	14	22	26	27	24
ethery	3	1	0	0	0
aldehydy	10	11	7	11	9
ketony	7	6	6	4	3
estery	11	12	22	10	8
karboxylové kyseliny	7	3	10	8	5
fenoly	2	2	1	1	1
heterocykly	4	7	1	7	4
laktony	0	0	4	4	0
ostatní	0	2	1	0	0
celkem	73	81	84	87	65



**Obrázek 6:** Vzhled želatinových cukrovinek jednotlivých výrobců (žlutá/citron)

## 4.2 Identifikace a kvantifikace alergenních aromaticky aktivních látek ve vzorcích

Jak již bylo zmíněno, problematika aromatických látek s alergenními účinky je v současné době velmi aktuální a je žádoucí se jimi zabývat i v oblasti potravin; zvláště to platí v případě výrazně aromatizovaných pochutin, které často konzumují i malé děti. Pro potřeby kvantifikace těchto látek byla nejprve provedena kalibrace a ověřeny vybrané validační parametry pro standardy vonných alergenů. Výsledné parametry shrnuje Tabulka 13.

**Tabulka 13:** Validované parametry metody SPME-GC-MS

sloučenina	R <sub>T</sub> [min]	R <sup>2</sup>	lineární rozsah [mg·ml <sup>-1</sup> ]	LOD [mg·ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [mg·ml <sup>-1</sup> ]
D-limonen	13,58	0,995	1·10 <sup>-6</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-6</sup>	1·10 <sup>-6</sup>
linalool	29,19	0,998	1·10 <sup>-8</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-8</sup>	1·10 <sup>-8</sup>
methyl 2-oktynoát	37,13	0,999	5·10 <sup>-9</sup> – 1·10 <sup>-4</sup>	5·10 <sup>-9</sup>	5·10 <sup>-9</sup>
citral 1	38,52	0,994	1·10 <sup>-5</sup> – 5·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-5</sup>	1·10 <sup>-5</sup>
citral 2	41,79	0,994	1·10 <sup>-5</sup> – 5·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-5</sup>	1·10 <sup>-5</sup>
citronellol	44,04	1,000	1·10 <sup>-6</sup> – 1·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-6</sup>	1·10 <sup>-6</sup>
geraniol	47,96	0,982	1·10 <sup>-8</sup> – 1·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-8</sup>	1·10 <sup>-8</sup>
benzylalkohol	49,20	0,994	1·10 <sup>-8</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-8</sup>	1·10 <sup>-8</sup>
hydroxycitronellal	51,99	0,971	1·10 <sup>-4</sup> – 5·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-4</sup>
cinnamal	55,71	0,992	5·10 <sup>-9</sup> – 5·10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-9</sup>	5·10 <sup>-9</sup>
kumarin	56,10	0,997	1·10 <sup>-3</sup> – 1·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	1·10 <sup>-3</sup>
benzylbenzoát	56,82	1,000	5·10 <sup>-9</sup> – 1·10 <sup>-5</sup>	5·10 <sup>-9</sup>	5·10 <sup>-9</sup>
eugenol	60,18	0,989	5·10 <sup>-5</sup> – 5·10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-5</sup>	5·10 <sup>-5</sup>
amylcinnamyl alkohol 1	62,52	0,969	1·10 <sup>-3</sup> – 1·10 <sup>1</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	1·10 <sup>-3</sup>
amylcinnamal 1	62,54	0,952	1·10 <sup>-4</sup> – 1·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-4</sup>
amylcinnamyl alkohol 2	62,80	0,934	1·10 <sup>-3</sup> – 1·10 <sup>1</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	1·10 <sup>-3</sup>
amylcinnamal 2	62,81	0,992	1·10 <sup>-5</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-5</sup>	1·10 <sup>-5</sup>
anisalkohol	63,66	0,994	1·10 <sup>-1</sup> – 1·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-1</sup>
isoeugenol	62,81	0,999	5·10 <sup>-1</sup> – 1·10 <sup>1</sup>	5·10 <sup>-1</sup>	5·10 <sup>-1</sup>
farnesol 1	63,33	0,994	1·10 <sup>-4</sup> – 5·10 <sup>-2</sup>	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-4</sup>
cinnamyl alkohol	63,78	0,999	1·10 <sup>-3</sup> – 1·10 <sup>1</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	1·10 <sup>-3</sup>
farnesol 2	64,50	0,996	1·10 <sup>-4</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-4</sup>
farnesol 3	64,92	0,999	1·10 <sup>-4</sup> – 1·10 <sup>-1</sup>	1·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-4</sup>

*R<sup>2</sup> – koeficient determinace; LOD – limit detekce; LOQ – limit kvantifikace*

Kvantifikace alergenních AAL byla provedena srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci (viz Tabulka 14).

**Tabulka 14:** Parametry standardů použité pro kvantifikaci

alergenní látka	c [mg·ml <sup>-1</sup> ]	R <sub>T</sub> [min]	plocha píku
D-limonen	0,00001	13,58	14906769
linalool	0,0001	29,19	378069283
methyl 2-oktynoát	0,000001	37,13	531366568
citral 1	0,00001	38,52	123755477
citral 2	0,00001	41,79	186226352
citronellol	0,01	44,04	504004840
geraniol	0,01	47,96	3616751393
benzylalkohol	0,1	49,2	3189311183
hydroxycitronellal	0,01	51,99	1132593984
cinnamal	1,11·10 <sup>-8</sup>	55,71	260820139
kumarin	10	56,1	241178901
benzylbenzoát	1,11·10 <sup>-8</sup>	56,82	867593683
eugenol	0,05	60,18	6316052613
amylcinnamyl alkohol 1	10	62,52	15578087
amylcinnamal 1	0,0001	62,54	6250604,00
amylcinnamyl alkohol 2	10	62,8	290290622
amylcinnamal 2	0,0001	62,81	103639901
anisalkohol	1	63,66	378814220
isoeugenol	0,5	62,81	29223135
farnesol 1	0,01	63,33	94404043
cinnamyl alkohol	10	63,78	329757219
farnesol 2	0,01	64,5	153976111
farnesol 3	0,01	64,92	141660675

Obsah alergenních AAL nalezených v jednotlivých vzorcích je uveden v Tabulce 15. Potravinářská legislativa zatím použití většiny vonných látek nereguluje, pro jakési hrubé přiblížení a posouzení možných nežádoucích účinků byla v této práci zvolena limitní koncentrace stanovená legislativou pro kosmetické přípravky, které se neoplachují neboli leave on (0,001%, tj.  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Jak je patrné z Tabulka tato koncentrace byla u některých AAL (konkrétně D-limonen, citronellol a benzylalkohol) překročena. Pro lepší orientaci jsou koncentrace přesahující tento stanovený limit v tabulce tučně vyznačeny.

D-limonen se nacházel ve vyšší koncentraci pouze ve žlutých vzorcích, citronellol a benzylalkohol v obou příchutích. Především v případě benzylalkoholu došlo k výraznému překročení limitu u tří vzorků (A03, A04 a A05) obou příchutí.

Vzhledem k tomu, že o možných účincích sledovaných alergenů na lidský organismus po konzumaci je známo jen velmi málo, i při překročení uvedené koncentrace se lze pouze dohadovat o jejich negativním působení. Nicméně jedná se o látky potenciálně nebezpečné pro citlivé jedince a z hlediska bezpečnosti potravin jim bude věnována pozornost v rámci dalšího zkoumání.

**Tabulka 15:** Obsah potenciálně alergenních látek v jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek

Potenciální alergen	Koncentrace ve vzorku [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]									
	A01		A02		A03		A04		A05	
	červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý	červený	žlutý
D-limonen	0,09±0,04	<b>15,76±0,31</b>	0,08±0,01	<b>13,75±1,96</b>	0,68±0,29	6,29±0,85	0,31±0,29	<b>14,72±10,04</b>	0,79±0,19	<b>14,26±1,14</b>
linalool	0,17±0,08	0,51±0,06	0,03±0,03	0,37±0,08	0,35±0,05	0,72±0,26	0,05±0,05	0,61±0,11	0,15±0,02	0,14±0,01
citral 1	nq	0,69±0,13	nq	0,21±0,09	0,01±0,01	0,01±0,01	nq	0,35±0,07	0,02±0,01	0,31±0,01
citral 2	nq	0,45±0,04	0,002±0,002	0,19±0,07	nq	0,02±0,02	0,01±0,01	0,37±0,07	0,02±0,01	0,24±0,01
citronellol	<b>13,04±16,49</b>	3,17±0,45	0,27±0,04	<b>18,16±0,66</b>	0,76±0,07	5,78 ±6,73	0,20±0,09	1,99±0,51	<b>23,21±8,87</b>	1,07±0,06
geraniol	0,39±0,49	0,35±0,09	nq	0,24±0,22	0,05±0,07	0,52±0,40	0,03±0,01	0,12±0,06	nq	0,09±0,04
benzylalkohol	0,44±0,01	nq	1,48±0,88	1,05±0,36	<b>88,55±1,36</b>	<b>30,26±7,67</b>	<b>62,56±0,08</b>	<b>49,78±0,23</b>	<b>28,25±0,88</b>	<b>94,74±0,47</b>
eugenol	0,24±0,06	0,17±0,02	0,07±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01	0,25±0,01	0,05±0,01	0,10±0,03	1,25±0,19	0,43±0,08

*nq – nebylo kvantifikováno*

## 5 ZÁVĚR

Dnešní trh nabízí velké množství nečokoládových cukrovinek a problematika aromatických látek s potenciálně alergenními účinky je v současnosti velmi aktuální. Je tedy žádoucí se těmito látkami v oblasti zabývat. Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat a následně kvantifikovat alergenní AAL ve vzorcích želé cukrovinek běžně dostupných na našem trhu.

Obsahem teoretické části této práce je literární rešerše k tématu aromaticky aktivních látek se zaměřením na potenciálně alergenní aromaticky aktivní látky. V experimentální části byly analyzovány vzorky želé cukrovinek ve tvaru medvídků od pěti různých výrobců; byly hodnoceny dvě vybrané barvy (příchutě): červená (jahoda) a žlutá (citron). Pro stanovení AAL ve vzorcích byla zvolena metoda SPME-GC-MS.

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno 246 sloučenin, z toho 30 uhlovodíků, 66 alkoholů, 7 etherů, 20 aldehydů, 24 ketonů, 56 esterů, 13 karboxylových kyselin, 3 fenoly, 16 heterocyklických sloučenin, 6 laktonů a 5 ostatních sloučenin (jednalo se o linalooloxid, methylsulfonylmethan, dimethylsulfoxid, 1,1-diisobutoxy-isobutan a propanamid). Nejčastěji se tedy ve vzorcích vyskytovaly alkoholy a estery.

Přestože se pro výrobu používají z velké části stejné suroviny, mezi vzorky byly nalezeny rozdíly v obsahu identifikovaných sloučenin jednak mezi jednotlivými barvami (příchutěmi), ale i u jednotlivých výrobců. Ve vzorcích A02, A03 a A04 byl nalezen vyšší počet sloučenin; s výjimkou vzorku A05 bylo ve žlutých vzorcích vždy více sloučenin než ve vzorcích červených. Nejvýraznější rozdíly mezi příchutěmi byly zjištěny v případě uhlovodíků, jelikož v příchuti citron se vyskytovaly uhlovodíky v třikrát až čtyřikrát větším počtu.

Součástí experimentální části byla také kvantifikace potenciálně alergenních AAL. Jelikož dosud není součástí legislativy České republiky zákon nebo nařízení o kontrole obsahu potenciálně alergenních AAL v potravinách, byla pro potřeby této práce použita legislativa kosmetická, konkrétně limitní koncentrace stanovená pro kosmetické přípravky, které se neoplachují neboli leave on (0,001 %, tj.  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

V jednotlivých vzorcích želatinových cukrovinek bylo nalezeno 7 potenciálně alergenních látek, konkrétně se jednalo o D-limonen, linalool, citral, citronellol, geraniol, benzylalkohol a eugenol. Ve všech vzorcích obsah některé z těchto látek přesahoval i výše zmíněnou koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a je tedy otázkou, zda by požití těchto želatinových bonbonů, nemohlo u citlivějších jedinců vyvolat alergické příznaky. Nejvýrazněji a nejčastěji (vzorky A03, A04 a A05) přesahoval stanovenou koncentraci benzylalkohol. Z naměřených hodnot je také patrné, že se vyšší koncentrace potenciálně alergenních látek vyskytovala častěji u příchuti citron než u příchuti jahoda; v případě příchuti jahoda byla koncentrace překročena pouze v pěti případech, zatímco v případě příchuti citron to bylo v osmi případech.

Použitá metoda SPME-GC-MS skýtá mnoho možností pro zkoumání aromaticky aktivních látek v želatinových cukrovinkách, avšak vyžaduje další validaci. V této práci bylo poukázáno na rozdíly v obsahu AAL v želatinových bonbonech a také bylo zkoumáno množství potenciálně alergenních AAL. Výsledky této práce by tak měly především posloužit jako odrazový můstek pro další výzkum.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. In: Sbírka zákonů. 2003. Dostupné z: <<http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>>
- [2] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Technologie čokolády a cukrovinek*. Vyd. 1. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 80-708-0365-7.
- [3] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožížnalství: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [4] Nařízení evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1334/2008 ze dne 16. prosince 2008 o látkách určených k aromatizaci a některých složkách potravin vyznačujících se aromatem pro použití v potravinách nebo na jejich povrchu a o změně nařízení Rady (EHS) č. 1601/91, nařízení (ES) č. 2232/96 a č. 110/2008 a směrnice 2000/13/ES. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 2. 11. 2016]. Dostupné z: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0034:0050:CS:PDF>>
- [5] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [6] PROCHÁZKOVÁ, Dana. *Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů*. Chemické listy. 2002, 96, s. 827-852. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: <<http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>>
- [7] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [8] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [9] Directive 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. In: 2003. 2003. Dostupné z: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:066:0026:0035:en:PDF>>

- [10] PLEVOVÁ, P. *Přítomnost alergenních vonných látek v nečokoládových cukrovinkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 69 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [11] ASCHEROVÁ, A. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 87 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [12] KOPŘIVA, Vladimír. *Vybrané kapitoly z biochemie potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-677-3.
- [13] KOUBEK, M. *Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromatických látek v sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 65 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [14] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [15] KRYKORKOVÁ, Jana; ČAPOUN, Tomáš. *Příspěvek využití techniky SPME při analýze těkavých organických látek metodou GC/MS*. 2009, s. 1-16. Dostupné z: <http://www.population-protection.eu/prilohy/casopis/5/31.pdf>
- [16] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [17] VONÁŠEK, František, Ladislav NOVOTNÝ a Emilie TREPKOVÁ. *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. ISBN 04-810-87.
- [18] BRETSCHEIDER, Rudolf a Jana ČOPÍKOVÁ. *Technologie cukrovarnictví: technologie cukrovinek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984.
- [19] SMÍŠEK, Josef. *Technologie výroby cukrovinek a trvanlivého pečiva: učební texty pro učební obor 06-97-02 Potravinářská výroba se zaměřením pro cukrovinky*. Praha: Čokoládovny, o.p., 1982.
- [20] SMOLKOVÁ, Eva, Věra PACÁKOVÁ a Ladislav FELTL. *Plynová chromatografie I.: Teoretické základy*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1975.
- [21] PICÓ GARCÍA, Yolanda, ed. *Chemical analysis of food: techniques and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12384862-8.
- [22] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 978-807-1576-471.
- [23] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.



- [24] LEHOTAY, Jozef. *Separáčné metódy v analytickej chémii*. Bratislava: Nakladateľstvo STU, 2009. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 978-80-227-3036-5.
- [25] BOJKO, Barbara, Erasmus CUDJOE, German A. GÓMEZ-RÍOS, et al. SPME – Quo vadis? *Analytica Chimica Acta*. 2012, **750**, 132-151. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.052. ISSN 00032670. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0003267012010021>>
- [26] HŘIVNA, Luděk. *Technologie sacharidů*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-022-5.
- [27] Gas chromatography. In: *Gas chromatography* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <[http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/triple\\_ocr\\_21c/further\\_chemistry/chromatography/revision/5/](http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/triple_ocr_21c/further_chemistry/chromatography/revision/5/)>
- [28] PAWLISZYN, Janusz. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley-VCH, c1997. ISBN 04-711-9034-9.
- [29] CHENG, Xianhao, Jennifer FORSYTHE a Earl PETERKIN. *Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways*. DOI: 10.1016/j.watres.2013.02.006. ISBN 10.1016/j.watres.2013.02.006.
- [30] SMOLKOVÁ, Eva, Věra PACÁKOVÁ a Ladislav FELTL. *Plynová chromatografie II.: Instrumentální část*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1975.
- [31] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [32] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [33] HRABĚ, Jan a Aleš KOMÁR. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin*. Vyškov: VVŠ PV, 2003. ISBN 80-723-1107-7.
- [34] ASHURST, P. R., ed. *Food flavourings*. 2nd ed. Glasgow: Blackie, 1991. ISBN 978-1-4612-7838-2.
- [35] CHARVÁTOVÁ, Michaela. *Multimediální pomůcka pro předmět Chemie potravních řetězců: využití metody SPME při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce (SOP)* [online]. [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <<http://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/metoda-spme/index.html>>

- [36] EDITORS: RAMÓN GERARDO GUEVARA-GONZÁLEZ a Irineo TORRES-PACHECO. *Advances in agricultural and food biotechnology*, 2006. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, 2006. ISBN 81-773-6269-0.
- [37] Stránky firmy LLUCH ESSENCE, S.L. vyrábějící esenciální oleje a aromata. Dostupné z: < <http://www.lluche.com/> >

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAL	Aromaticky aktivní látky
EC	Evropská komise
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
nq	Nebylo kvantifikováno
PLOT	Porous Layer Open Tubular
R <sup>2</sup>	Koeficient determinace
SCOT	Support Coated Open Tubular
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
WCOT	Wall Coated Open Tubular

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

*Příloha 1: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A01 (červený)*

*Příloha 2: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A01 (žlutý)*

*Příloha 3: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A02 (červený)*

*Příloha 4: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A02 (žlutý)*

*Příloha 5: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A03 (červený)*

*Příloha 6: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A03 (žlutý)*

*Příloha 7: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A04 (červený)*

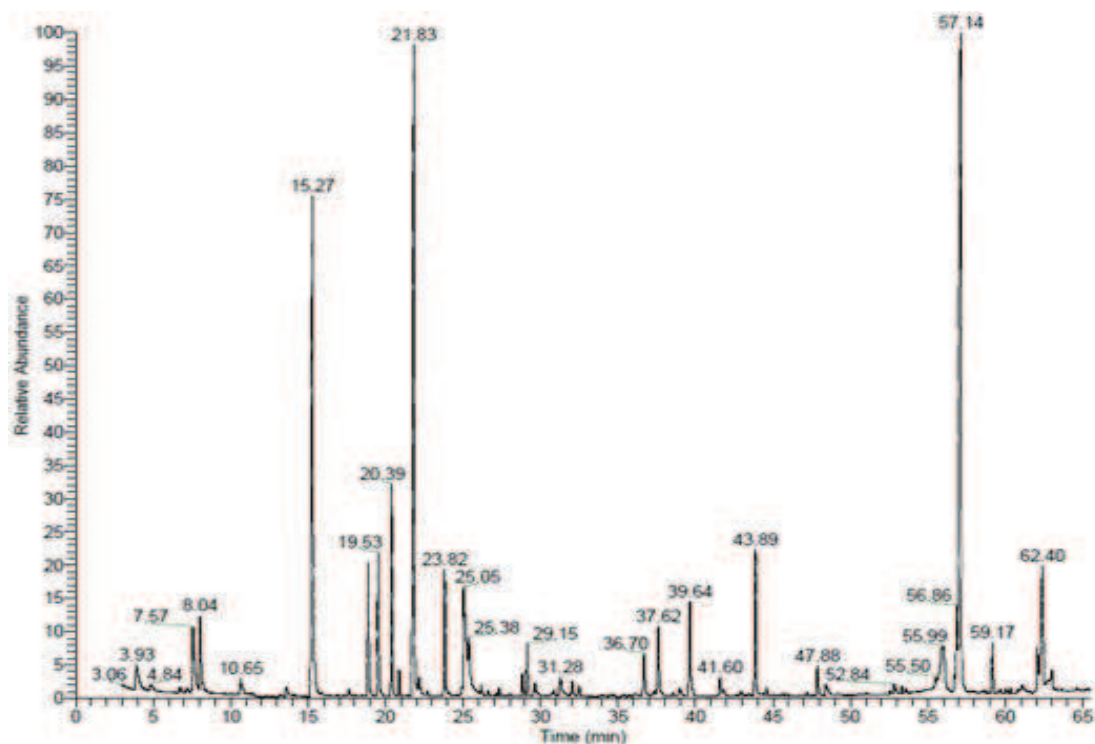
*Příloha 8: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A04 (žlutý)*

*Příloha 9: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A05 (červený)*

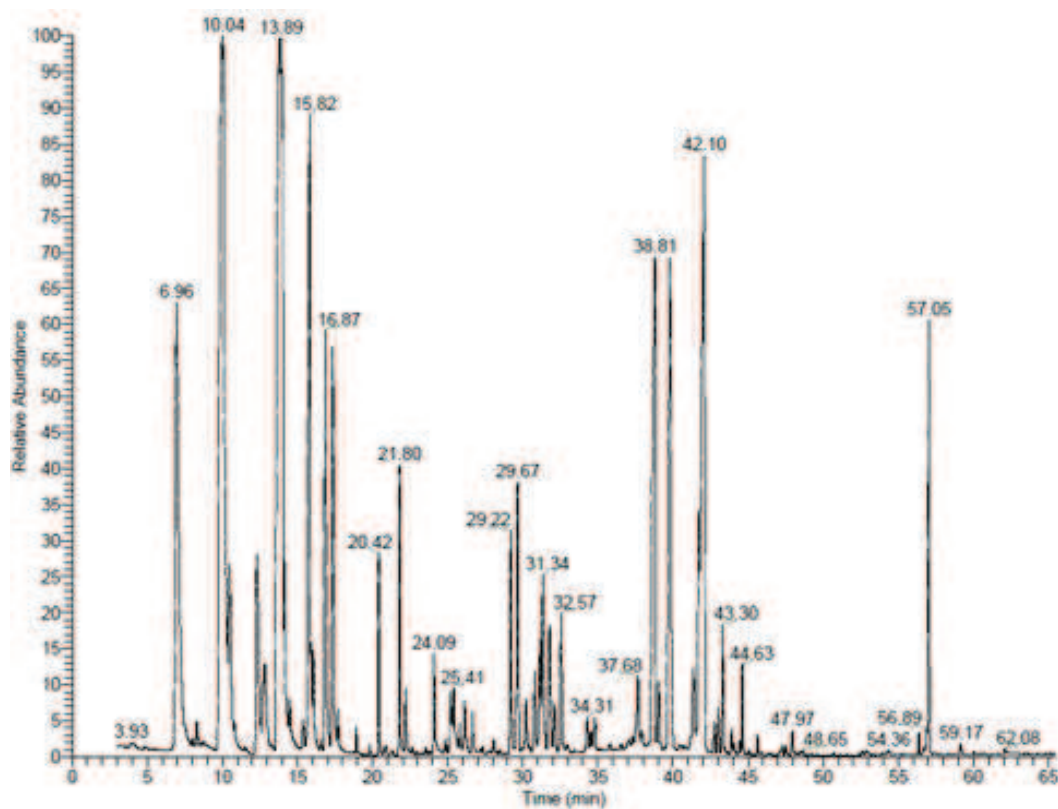
*Příloha 10: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A05 (žlutý)*

## 9 PŘÍLOHY

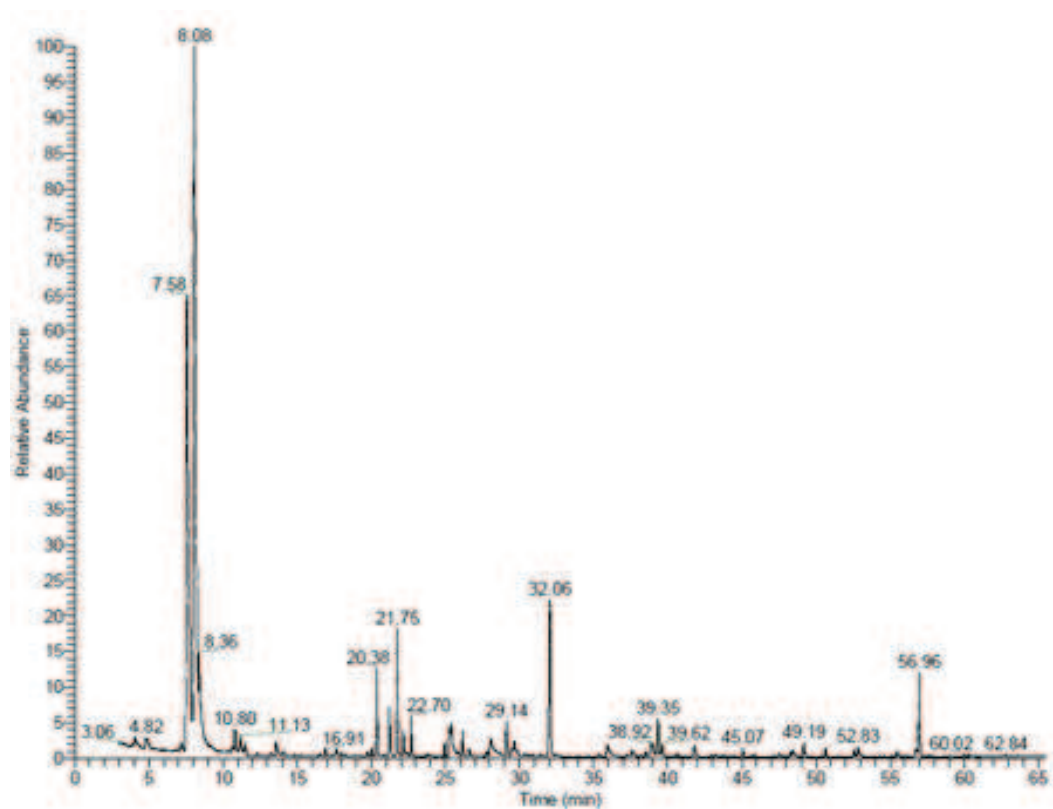
*Příloha 1: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A01(červený); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)*



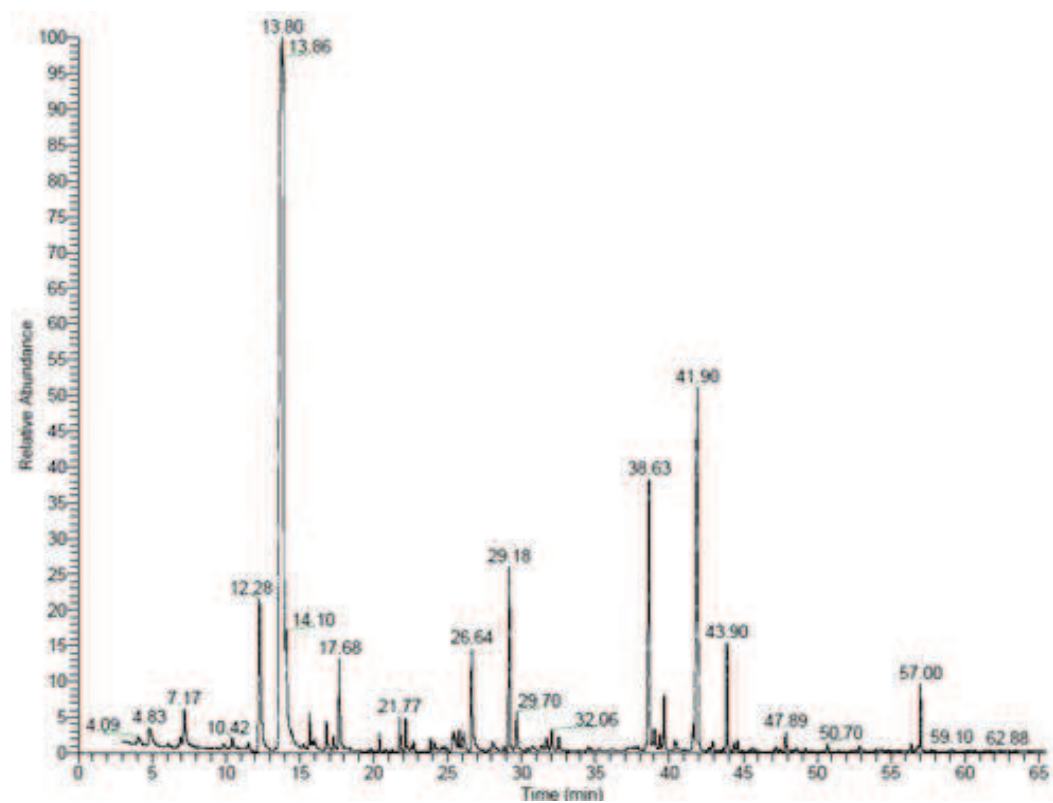
*Příloha 2: Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A01 (žlutý); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)*



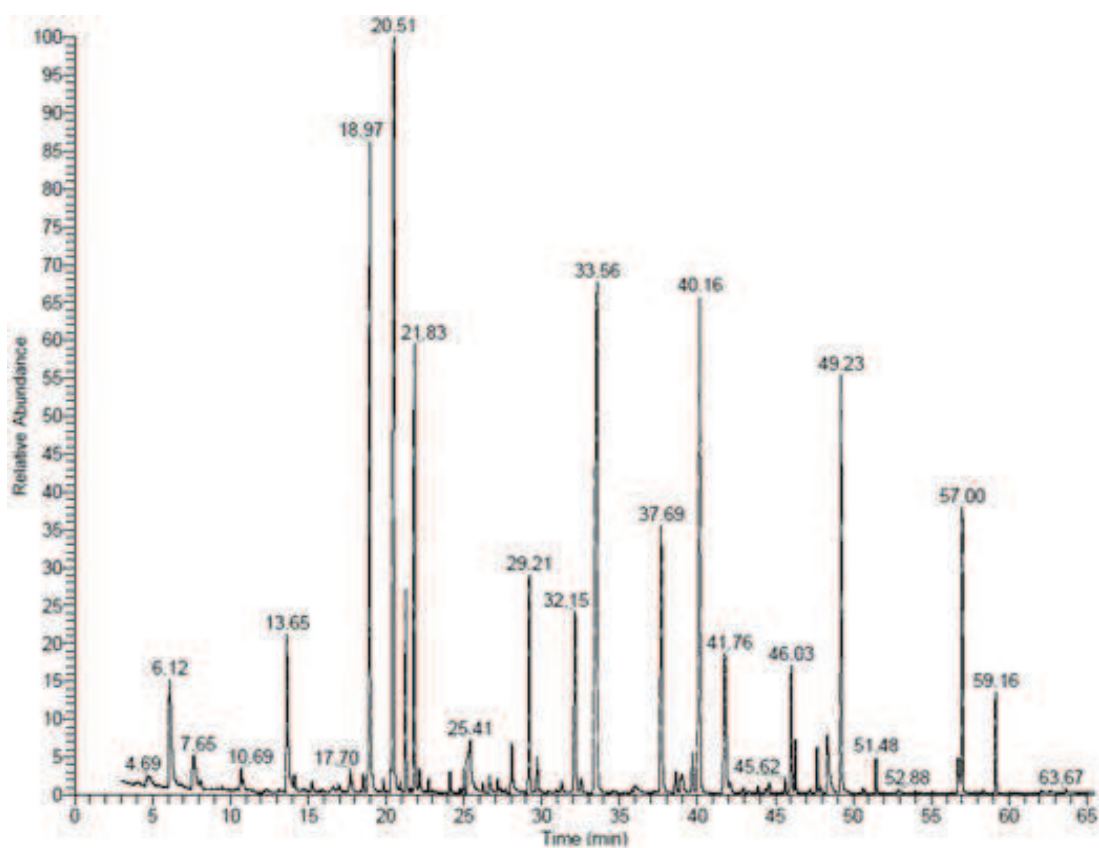
**Příloha 3:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A02 (červený); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)



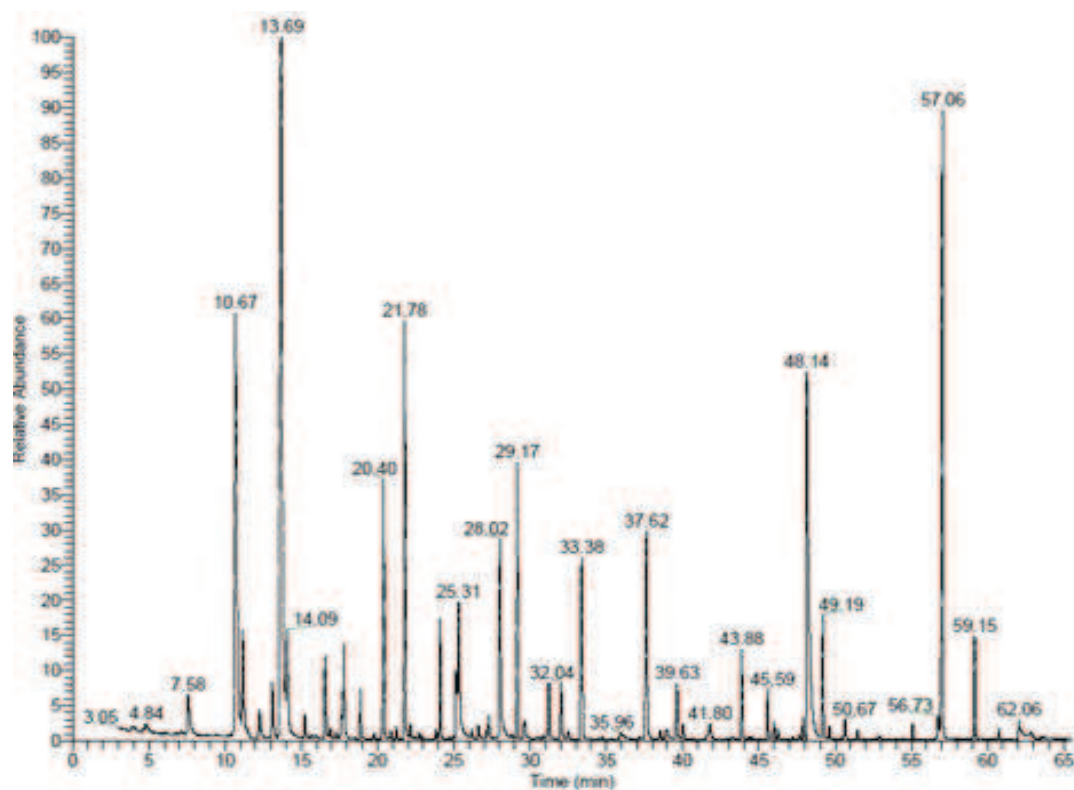
**Příloha 4:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A02 (žlutý); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)



**Příloha 5:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A03 (červený); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)

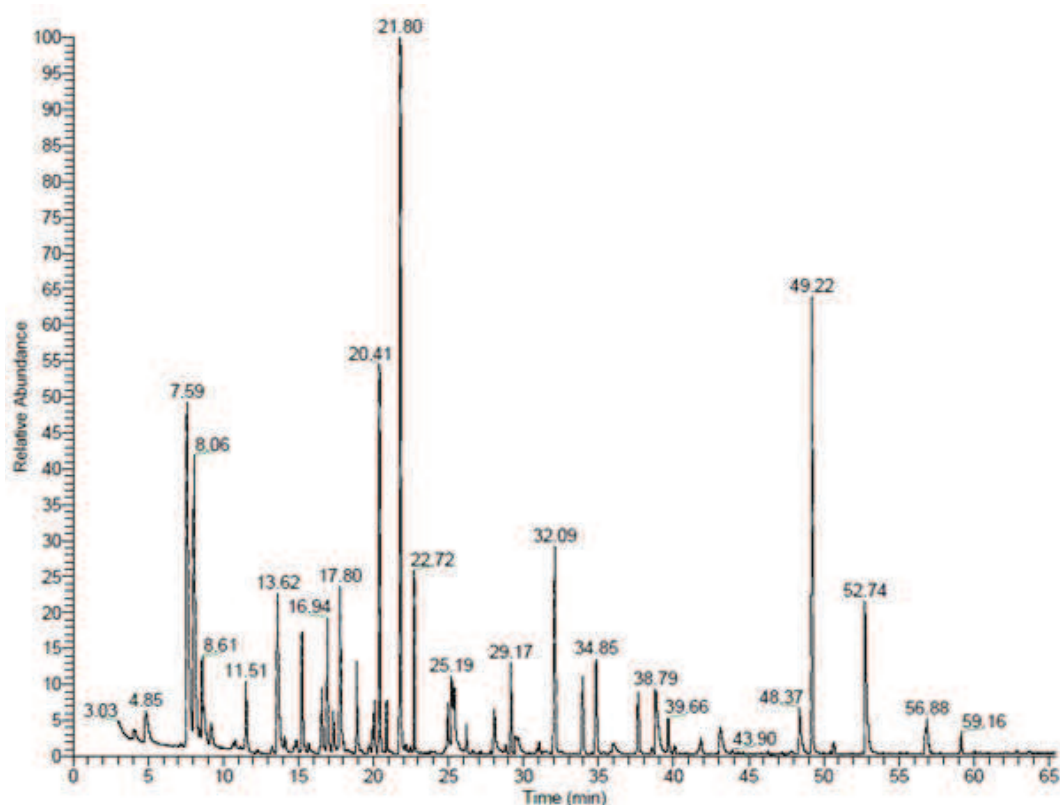


**Příloha 6:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A03 (žlutý); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)

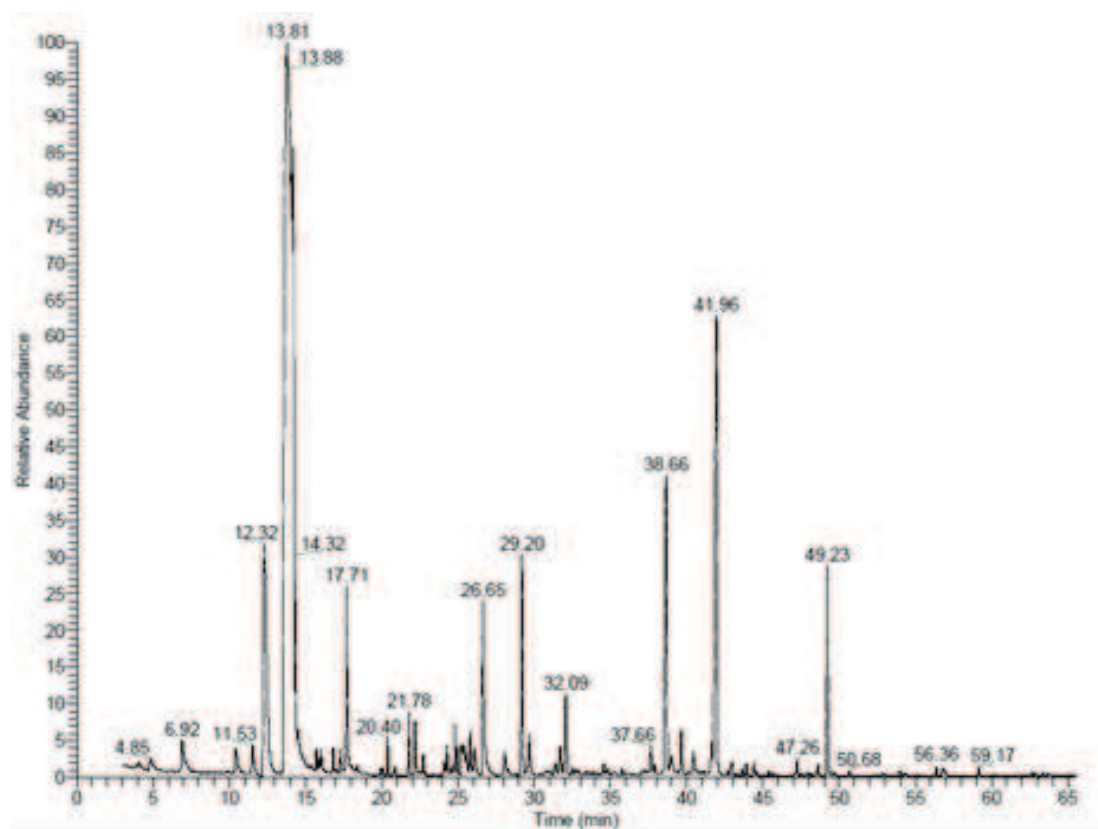




**Příloha 7:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A04 (červený); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)

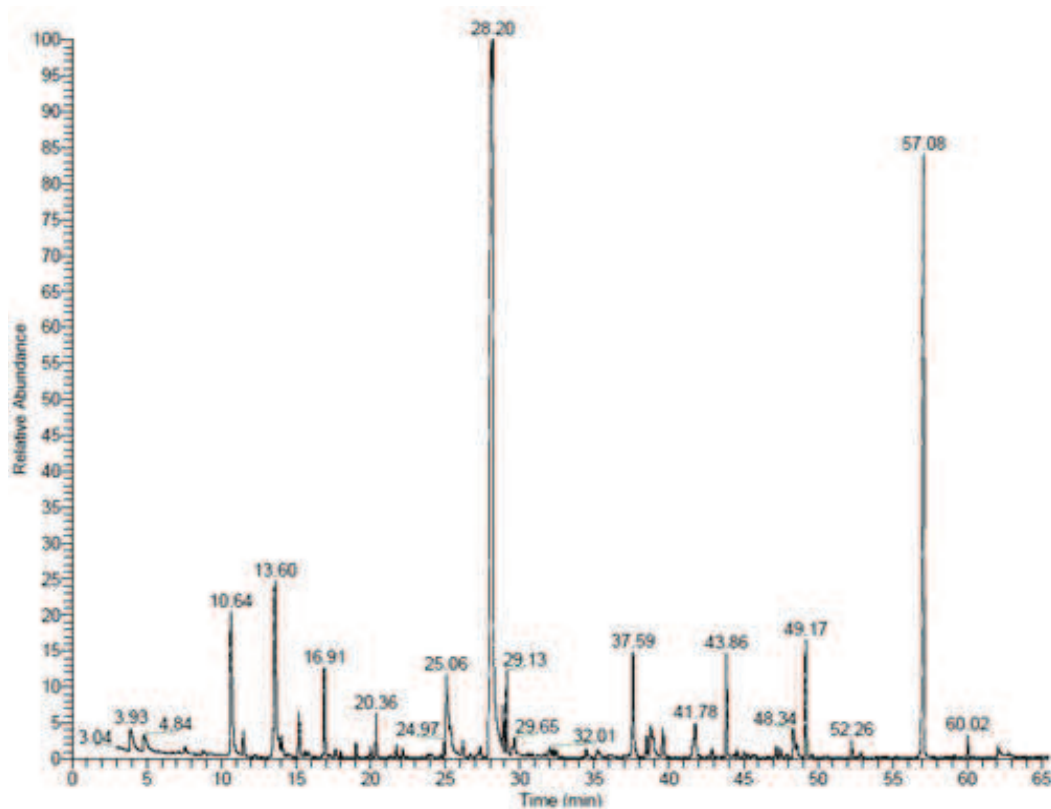


**Příloha 8:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A04 (žlutý); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)





**Příloha 9:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A05 (červený); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)



**Příloha 10:** Chromatogram identifikovaných vonných látek ve vzorku A05 (žlutý); identifikace sloučenin na základě retenčních časů (viz Tabulka 9)

